Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Medicina
Licenciatura en Biomedicina

Título:

Modulación eferente sobre la aferencia vestibular. Efecto de la activación del receptor NOP sobre la excitabilidad de las neuronas aferentes vestibulares en cultivo primario.

Tesis profesional que para obtener el grado de Licenciado en Biomedicina presenta:

Jesua Roberto Bueno Gasca
Matrícula 201239997

Director de Tesis y Asesor Metodológico:
D.C. Emmanuel Seseña Méndez

Puebla, Pue. Noviembre de 2018.

Director de Tesis

Coordinación de Biomedicina

Instituto de Fisiología

Eficiencia terminal

Este trabajo pudo ser realizado gracias al apoyo de un sinnúmero de personas.

Quiero agradecer en particular al Dr. Emmanuel Seseña por su inagotable paciencia y compromiso durante estos años.

Al Dr. Enrique Soto y a la Dra. Rosario Vega por recibirme en su laboratorio y haber enriquecido mi aprendizaje.

A la Dra. Amira Flores por sus correcciones y por su apoyo durante la carrera.

A mis padres, Beatriz y Jorge quienes me equiparon con las herramientas para terminar la licenciatura exitosamente.

A mi hermano Jere por sobrevivir conmigo siempre.

Steve, Marie, Cathleen, Leti, Raquel, Arantza, Adriana, Jaasiel, Abby, gracias por alegrar mis días.

A Antoinette Moreno por sus consejos y apoyo.

A Elisa, quien fue la mejor experiencia de aprendizaje que obtuve de biomedicina.

A los amigos que hice en el laboratorio y a lo largo de la carrera quienes enriquecieron mi aprendizaje. Job, Audrey, Ignacio, Francisco, Katya, Jorge, Octavio, Citlalli, Aida, Serhii, Alennie, Kannan, Imam, Khuong, Eftekhar.

A todos mis amigos y familiares que harían de esta lista algo interminable, gracias por su compañía todo este tiempo.

ÍNDICE

i. Resumen v

1. Antecedentes 1

1.1 Antecedentes generales 1

a. Generalidades del sistema vestibular 1

b. Excitabilidad en las NAV 6

c. Modulación eferente del sistema vestibular 8

1.2 Antecedentes específicos 11

a. Estructura y función del sistema N/O FQ -NOP 11

b. Sistema N/O FQ – NOP en el sistema vestibular 13

2. Planteamiento del problema 14

2.1 Pregunta de investigación 15

3. Hipótesis 15

4. Justificación 15

5. Objetivos 16

5.1 Objetivo general 16

5.2 Objetivos específicos 16

6. Materiales y métodos 17

6.1 Bioética 17

6.2 Cultivos neuronales 17

a. Soluciones de registro 19

b. Set de registro 20

c. Protocolos de registro 20

d. Secuencia de registro 22

6.4 Análisis 23

6.5 Diseño experimental y análisis estadístico 25

7. Resultados 25

7.1 Propiedades pasivas de las células registradas 25

7.2 Modulación del PA por N/O FQ 26

7.3 Efecto sobre la descarga repetitiva 28

7.4 Efecto sobre la descarga dinámica 28

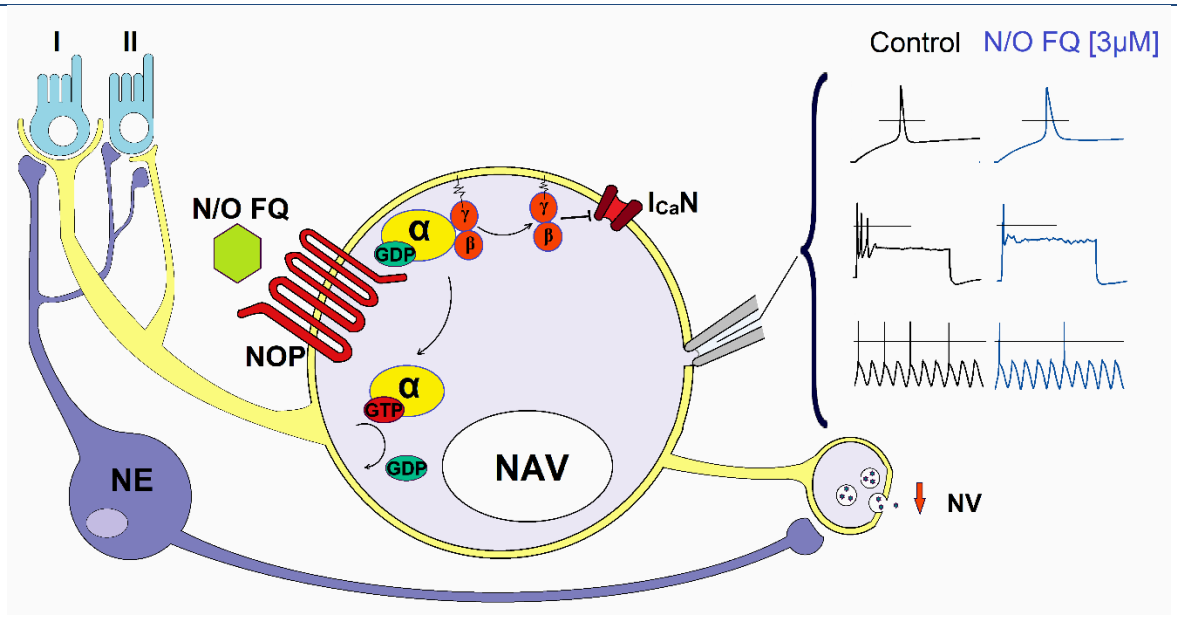
7.5 Evaluación del efecto de N/O FQ con bloqueo de la proteína Gβγ 30

8. Discusión 32

9. Conclusiones 34

10. Referencias 35

i. Resumen



La activación del receptor NOP en neuronas aferentes vestibulares (NAV) modula la corriente de calcio tipo N por medio de interacción con la subunidad Gβγ por el mecanismo dependiente de voltaje. Esta modulación afecta la morfología del potencial de acción, su comportamiento en la descarga repetitiva y la respuesta dinámica. Suponemos que estos efectos producen una disminución en la liberación de neurotransmisor hacia las neuronas de segundo orden con las cuales hacen sinapsis en los núcleos vestibulares (NV). Las neuronas eferentes (NE) hacen sinapsis tanto con las células ciliadas de tipo II como con las NAV.

El sistema vestibular sensa aceleraciones lineares y angulares y contribuye al equilibrio, la postura, la estabilidad de la mirada, la orientación en el espacio y la navegación (Cullen y Sadeghi, 2008). Previo a este trabajo se ha demostrado que la activación del receptor opioide N/O FQ (NOP) en neuronas aferentes vestibulares (NAV) modula la corriente de calcio tipo N a través de un mecanismo dependiente de voltaje (Seseña y cols., 2016), sin embargo; no se había comprobado que esta modulación impacta de forma significativa sobre los potenciales de acción o la descarga de estos.

El sistema N/O FQ-NOP es considerado un potencial blanco farmacológico como tratamiento ante lesiones vestibulares (Awwad y cols., 2016) y otras patologías (Lambert, 2008). Para estudiar el efecto de N/O FQ sobre NAV, realizamos experimentos electrofisiológicos *in vitro* con NAV de rata usando la configuración de célula completa y parche perforado en la modalidad de fijación de corriente. Analizamos las consecuencias de la aplicación de N/O FQ sobre la morfología del potencial de acción (PA) con un protocolo de pulsos cuadrados despolarizantes y sobre el patrón de descarga de PA con estímulos sinusoidales.
En las NAV la aplicación de N/O FQ [3 μM] aumenta la duración del PA al 50 % y disminuye la tasa máxima de repolarización (TMR). En las células que presentaron descarga repetitiva, la N/O FQ [3 μM] disminuyó el número de PAs. En la descarga dinámica estudiada con estimulación sinusoidal, la aplicación de N/O FQ [3 μM] redujo la frecuencia de descarga sin modificar su regularidad.

Estos resultados sugieren que el decremento en la frecuencia de descarga de aferentes vestibulares modula negativamente la liberación de neurotransmisor a las neuronas de segundo orden. Esta modulación de la entrada aferente vestibular puede estar involucrada en la discriminación entre cambios de posición voluntarios e involuntarios (Angelaki y Cullen, 2008).

1. Antecedentes

1.1 Antecedentes generales

a. Generalidades del sistema vestibular

El sistema vestibular sensa aceleraciones lineares y angulares a las cuales es sometida la cabeza de los animales, lo cual les ayuda a orientarse y a navegar en el espacio (Stackman y Herbert, 2002; Matthews y cols., 1989; Cullen y Sadeghi, 2008; Yoder y Taube, 2014). El sistema vestibular participa en el mantenimiento del equilibrio, la postura y la estabilidad de la mirada frente a cambios de posición causados por el entorno o por actividad locomotora del mismo organismo (Eatock y Songer, 2011; Cullen y Sadeghi, 2008).

La información de las neuronas aferentes vestibulares (NAV) es modulada de forma temprana por entradas provenientes del sistema visual, entradas propioceptivas, e influencias del tallo cerebral, el cerebelo y la corteza cerebral (Khan y Chang, 2013). En los circuitos vestibulares, las neuronas de segundo orden con frecuencia también son neuronas premotoras (Vidal y cols., 2015). De estos circuitos emergen los reflejos vestibulares: vestíbulo-ocular (que facilita la estabilidad de la mirada durante el movimiento) (Angelaki y Cullen, 2008), vestíbulo-espinal (que participa en el control de la postura y el balance del cuerpo) (Hain y Helminski, 2014), y vestíbulo-cólico (que recluta a la musculatura del cuello para mantener la posición de la cabeza) (Keshner, 2009).

Los órganos sensoriales vestibulares se encuentran en el aparato vestibular periférico, una estructura que en los mamíferos se encuentra en el oído interno, dentro de la porción petrosa del hueso temporal (Khan y Chang, 2013; Goldberg, Walker y Hudspeth, 2012; Dickman, 2012). Está formado por estructuras capaces de detectar las aceleraciones lineales (utrículo y sáculo) y angulares (canales semicirculares anterior, posterior y lateral) de la cabeza (Cullen y Sadeghi, 2008; Goldberg y cols., 2012; Dickman, 2012; Khan y Chang, 2013).

El aparato vestibular está alojado dentro del laberinto óseo y delimitado por el laberinto membranoso. El laberinto membranoso está suspendido en el laberinto óseo por medio de tejido conectivo (Khan y Chang, 2013). En el espacio creado entre el laberinto óseo y el laberinto membranoso fluye un líquido llamado perilinfa el cual tiene una composición semejante al líquido cefalorraquídeo con una concentración alta de sodio [150 mM] con relación a la de potasio [7 mM] (Dickman, 2012; Hain y Helminski, 2014), éste líquido es drenado por el conducto perilinfático hacia el espacio subaracnoideo adyacente (Khan y Chang 2013), mientras que el interior del laberinto membranoso está lleno de endolinfa, cuya composición (Potasio [150 mM] y sodio [16 mM]) se asemeja a la del líquido intracelular (Dickman, 2012; Khan y Chang, 2013). Se ha propuesto que la endolinfa en *Rana esculenta* es secretada por el epitelio del laberinto membranoso en la región de las ámpulas en los canales semicirculares (Bernard, Ferrary y Sterkers, 1986) y que es producida por células de la estría vascularis en mamíferos (Patuzzi, 2011) también ha sido sugerido que la endolinfa circula de forma localizada por secciones en vez de fluir por toda la luz del laberinto membranoso (Lawrence, 1966). Las células del epitelio que forma el laberinto membranoso poseen uniones estrechas, su membrana basolateral es bañada por perilinfa mientras la apical se encuentra en contacto con la endolinfa (Sterkers, Ferrary y Amiel, 1988).

Todos los vertebrados craneados poseen dos tipos de estructuras especializadas que se encargan de sensar las aceleraciones lineares y angulares respectivamente (Beisel, Wang-Lundberg, Maklad y Fritzsch, 2005). Las aceleraciones lineales son detectadas por los órganos otolíticos que consisten en una población de células ciliadas cuyos cilios están inmersos en una matriz gelatinosa cubierta por un depósito de cristales de carbonato de calcio (otolitos) que se denomina otoconia (Rutka, 2004). Los ciclóstomos (mixinos y lampreas) poseen una sola mácula cubierta de otoconia que les permite sensar la aceleración gravitacional. Durante el proceso evolutivo se han desarrollado tres órganos otolíticos (Figura 1) que reciben los nombres de: utrículo, sáculo y lagena

(esta última se encuentra en peces, anfibios, aves y monotremas) (Beisel y cols., 2005) (Khorevin, 2008).

El laberinto también alberga tres canales semicirculares (anterior o superior, posterior y horizontal o lateral) que se encargan de detectar la aceleración angular (Rutka, 2004).

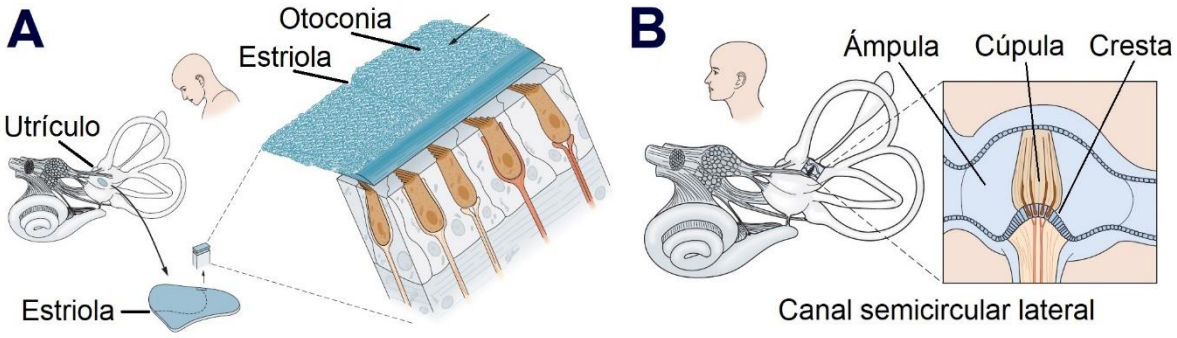


Figura 1. Órganos sensoriales vestibulares. A El utrículo es un órgano otolítico que sensa aceleraciones lineares. La capa de cristales de carbonato de calcio se conoce como otoconia. Los cilios presentan una orientación polarizada con relación a la estriola. **B** El ámpula alberga al neuroepitelio de los canales semicirculares. Las células ciliadas se encuentran agrupadas en la cresta ampular y proyectan sus cilios dentro de la cúpula (Kandel, 2012).

El epitelio sensorial se ubica en una estructura que se llama ámpula, los cilios de las células sensoriales (células ciliadas) se insertan en un diafragma gelatinoso que recibe el nombre de cúpula (Goldberg y cols., 2012) (Figura 1).

Las células ciliadas de todos estos órganos sensoriales se encargan de transducir estímulos mecánicos a señales eléctricas que se conocen como potenciales de receptor (Goldberg y cols., 2012; Hudspeth, 2012; Hain y Helminski, 2014).

La estructura básica de una célula ciliada incluye un único cinocilio y aproximadamente 60-100 estereocilios en su membrana apical (Dickman, 2012). Los estereocilios están ordenados según su tamaño de mayor a menor alejándose del cinocilio. El cinocilio se asemeja a un cilio verdadero y su estructura consiste en 9 pares de microtúbulos acomodados alrededor de un par central, mientras los

estereocilios están formados por filamentos paralelos ricos en actina rodeados por diversas isoformas de miosina (Corey y Holt, 2016).

Es posible clasificar a las células ciliadas como células tipo I y tipo II. Las células ciliadas de tipo I tienen forma de matraz y las células ciliadas tipo II son cilíndricas. Los vertebrados anamniotas (peces y anfibios) poseen únicamente células ciliadas de tipo II, mientras que los vertebrados amniotas (aves, reptiles y mamíferos) poseen tanto células del tipo I como del tipo II (Popper y Fay, 1997; Eatock y Hurley, 2003). Ambos tipos celulares tienen propiedades particulares; las células tipo I forman sinapsis caliciformes con sus aferentes, mientras que las de tipo II forman sinapsis en forma de botón (Dickman, 2012).

El tipo de sinapsis que se forma también permite clasificar a las NAV en tres grupos: caliciformes (en la estriola de la mácula de los órganos otolíticos), en forma de botón (en la extraestriola) y dimórficas (en ambas zonas) (Eatock y Songer, 2011). Tanto las células ciliadas como las neuronas aferentes reciben inervación eferente vestibular que modula su sensibilidad por medio de transmisión colinérgica (Eatock y Songer, 2011; Dickman, 2012), por péptido relacionado al gen de la calcitonina y por otros neuromoduladores (Dickman, 2012).

Los estímulos mecánicos producen una respuesta eléctrica (potencial receptor) por medio de canales catiónicos mecanosensibles (Hudspeth, 2012). La deflexión de los cilios en dirección excitatoria (hacia el cinocilio) produce que dichos canales se abran, mientras que la deflexión en la dirección opuesta hace que se cierren (Corey y Holt, 2016).

La probabilidad de apertura de los canales de mecanotransducción ubicados en los extremos de los estereocilios es determinado por elementos elásticos llamados *“tip-links”* que conectan a los extremos ciliares unos con otros (Hudspeth, 2012).

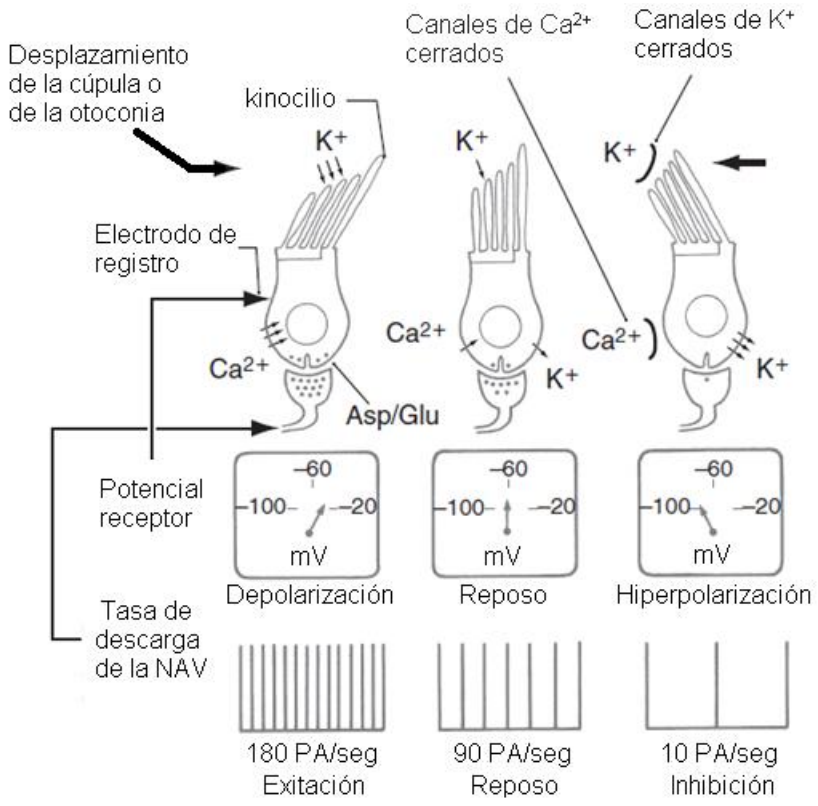


Figura 2. Respuesta fisiológica de las células ciliadas y sus fibras aferentes vestibulares. *Asp*, aspartato; *Glu*, glutamato; *PA* potenciales de acción. La deflexión de los cilios en dirección del cinocilio *(izq.)* provoca que se despolarice el potencial receptor y aumente la liberación de neurotransmisor. Este incremento en la transmisión sináptica produce una mayor descarga en las NAV. Cuando los cilios se flexionan en la dirección opuesta *(der.)*, el potencial receptor se hiperpolariza, disminuye la liberación de neurotransmisor y se reduce la tasa de descarga en las NAV (Dickman, 2012).

Cuando los canales mecanotransductores se abren, la mayor parte de la corriente está dada por entrada de potasio, pero una porción importante también se debe al influjo de calcio (Eatock y Songer, 2011). Un receptor potencial despolarizante (excitatorio) causa la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (Eatock y Songer, 2011). La entrada de calcio a la célula ciliada induce la liberación de neurotransmisores hacia la sinapsis con la neurona aferente vestibular lo que provoca un incremento en su frecuencia de disparo. Cuando los canales mecanosensibles se deflexionan en dirección opuesta al cinocilio, el resultado es hiperpolarización de la membrana; en consecuencia, disminuye la probabilidad de apertura de canales de calcio dependientes de voltaje lo que

implica menor liberación de neurotransmisor y menor frecuencia de disparo de las fibras aferentes vestibulares (Corey y Holt, 2016) (Figura 2).

Las señales del vestíbulo son llevadas de los órganos receptores a los núcleos vestibulares del tallo cerebral por medio del octavo par craneal (conocido como nervio vestibulococlear o estatoacústico) (Hain y Helminski, 2014). Los somas de las NAV se encuentran en el ganglio vestibular o de Scarpa el cual se halla en el meato auditivo interno. El nervio vestibular superior inerva al utrículo y a los canales semicirculares horizontal y anterior. El nervio vestibular inferior inerva al canal semicircular posterior y el sáculo (Goldberg y cols., 2012). Cada ganglio vestibular alberga alrededor de $2x10^4$ cuerpos neuronales en el mono (Khan y Chang, 2013; Goldberg, 2014).

b. Excitabilidad en las NAV

Las NAV presentan una descarga basal en la ausencia de estimulación (fuera de la ejercida por la gravitación de la tierra), hecho que había sido anticipado por Löwenstein y Sand en 1936. En los monos ésta descarga basal oscila alrededor de 100 Hz (Goldberg, 2014). Löwenstein concluyó que la presencia de una descarga de fondo ofrecía tres ventajas: permite que las aferentes respondan bidireccionalmente, elimina de forma efectiva un umbral sensorial y provee una entrada significativa al tallo cerebral que contribuye al tono postural (Löwenstein, 1936).

Dado a que las propiedades direccionales de una unidad otolítica se resumen en un vector de polarización, la respuesta a variaciones en ejes de inclinación o rotación es una función sinusoidal sobre una tasa constante. Esta tasa puede ser considerada como la frecuencia de descarga basal porque su constancia implica una falta de respuesta a fuerzas lineales (Goldberg, 2014).

Se pueden clasificar a las NAV con base en la regularidad de su descarga basal. Algunas aferentes vestibulares presentan una descarga regular de potenciales de acción, mientras en otras la descarga es irregular. La regularidad de descarga se mide por un coeficiente de variación (cv) que es la razón de la desviación estándar de intervalos inter-evento (s) entre la media del intervalo (x). cv = s/x. Dado que el coeficiente de variación cambia junto con la media, se utiliza una estadística normalizada (coeficiente de variación a un intervalo medio cv*). En mamíferos como el mono ardilla el cv* a un intervalo medio de x = 15 ms puede variar hasta más de veinte veces, desde < 0.03 en las unidades más regulares hasta > 0.6 en las más irregulares (Goldberg, 2000).

Conocer la regularidad de descarga es útil porque las unidades clasificadas como regulares o irregulares difieren en sus propiedades intrínsecas y en sus características de descarga. Las NAV irregulares presentan mayor respuesta a estímulos naturales y son más sensibles a corrientes galvánicas que las NAV regulares (Goldberg, 2014).

La regularidad de las NAV resulta de la integración de las propiedades intrínsecas, entre ellas sus canales iónicos dependientes de voltaje, y de la neuromodulación ejercida sobre ellas. Algunos canales iónicos voltaje dependientes claramente relacionados con la regularidad de la descarga en estas neuronas son los KCNQ, del subtipo Kv1 y Kv7, los cuales son los responsables de la ILV K (Eatock, 2008; Kalluri y cols., 2010).

La conclusión es que cuando el codificador de descarga, el mecanismo encargado de transformar despolarizaciones postsinápticas en trenes de descarga tiene una ganancia mayor, la descarga es más irregular, es decir; cierta despolarización resulta en un incremento mayor en la frecuencia de descarga cuando se trata de aferentes irregulares (Holt, Lysakowski y Goldberg, 2011).

Se ha encontrado una relación entre la población de canales en NAV con el tamaño de sus somas (Limón y cols., 2005) y una relación entre su morfología y su regularidad de descarga (Goldberg, 2000). A nivel celular, se han estudiado

diversas corrientes iónicas voltaje-dependientes y ligando-dependientes que influyen en la descarga de las NAV.

Entre las corrientes que se han descrito en las NAV se encuentran las corrientes iónicas dependientes de voltaje I_{Na} (Liu y cols., 2016), I_K (Rennie y Streeter, 2005; Iwasaki y cols., 2008; Kalluri y cols., 2010), HVA y LVA ICa (Desmadryl y cols., 1997; Autret y cols., 2005), $I_{K,Ca}$ (Limón y cols., 2005), $I_{K,Na}$ (Cervantes y cols., 2013). Y corrientes ligando-dependientes TRPV 1, 2, 3 y 4 (Kitahara, Li y Balaban, 2005; Ishibashi y cols., 2009), ASIC (Mercado y cols., 2006), 5-HT3 (Takimoto y cols., 2014), GABA (Cortes, 2013) y NMDA (Soto y cols., 1993).

c. Modulación eferente del sistema vestibular

La actividad de las NAV y las células ciliadas es modulada por neuronas eferentes (Holt, Lysakowski y Goldberg, 2010). Modular la actividad aferente se relaciona al hecho de que los organismos deben aprender qué representaciones en el mundo son relevantes de acuerdo con el contexto: los estímulos pueden ser indicadores de situaciones diversas que significan seguridad, comida o peligro, entre otros. Información tanto sobre acaecimientos importantes como sobre los que no lo son es adquirida a través de los órganos sensoriales. En respuesta a esta información se activa una conducta de acercamiento o evitación (Ryugo, 2010). Los estímulos que carecen de significancia inmediata son relegados a “segundo plano” y pueden ser ignorados. La modulación efectuada por los sistemas eferentes sensoriales puede estar dada por retroalimentación positiva o negativa sobre la vía aferente (Ryugo, 2011).

El sistema nervioso central influye la actividad del aparato vestibular por medio de neuronas eferentes cuyos somas se encuentran en el tallo cerebral (Leijon y Magnusson, 2014). Las fibras eferentes son en número mucho menores a las aferentes siendo alrededor de 400-600 en los mamíferos (Goldberg y Fernández, 1980). Aunque en un principio se especuló que por esta diferencia numérica el sistema eferente vestibular tendría un efecto poco significativo sobre la actividad aferente, posteriormente se encontró que las neuronas del sistema eferente

compensan esta discrepancia de cantidad con un alto grado de arborización que les permite hacer sinapsis con múltiples fibras aferentes y células ciliadas (Goldberg y Fernández, 1980; Leijon y Magnusson, 2014).

Las células del neuroepitelio del sistema vestibular en mamíferos reciben entradas eferentes del tallo cerebral (Holt, Lysakowski, y Goldberg, 2010; Leijon y Magnusson, 2014). El efecto de estas entradas no ha sido estudiado extensivamente sin embargo se ha descrito que la estimulación de las fibras del tallo cerebral cambia la sensibilidad de los axones aferentes y de las células ciliadas en el neuroepitelio. La estimulación del sistema eferente disminuye la excitabilidad de algunas células ciliadas, lo cual es un efecto esperable si es que la activación de las fibras eferentes produjera potenciales postsinápticos inhibitorios en las células ciliadas. Pero existen otras células ciliadas cuya excitabilidad aumenta con la activación de las fibras eferentes (Kandel, 2012).

Von Holst y Mittelstaedt propusieron en 1950 la hipótesis de que el sistema nervioso central diferencia entre señales sensoriales que se originan voluntariamente y aquéllas que resultan de eventos externos enviando una “copia eferente” del comando motor hacia las áreas sensoriales. A su vez, esta señal anticipatoria es sustraída de la señal sensorial entrante para omitir de forma selectiva la porción resultante de las acciones propias del animal. En el sistema vestibular se ha descrito una vía eferente hacia el laberinto que podría ser responsable de este mecanismo. Los somas eferentes vestibulares se ubican en la región periabducens y proyectan directamente hacia las células ciliadas en el laberinto a través del VIII par craneal (Holt, Lysakowski y Goldberg, 2010; Ryugo, 2010; Leijon y Magnusson, 2014). Se ha propuesto que el sistema eferente de los primates reduce la sensibilidad del nervio vestibular durante los movimientos de cabeza voluntarios. Además de recibir entrada directa de las aferentes vestibulares, los núcleos vestibulares reciben proyecciones sustanciales de la corteza cerebral, el cerebelo y otras estructuras del tallo cerebral. Esto puede proveer a los núcleos vestibulares con indicaciones que podrían ser usadas para discriminar entre rotaciones de la cabeza activas y pasivas (Cullen y Roy, 2004).

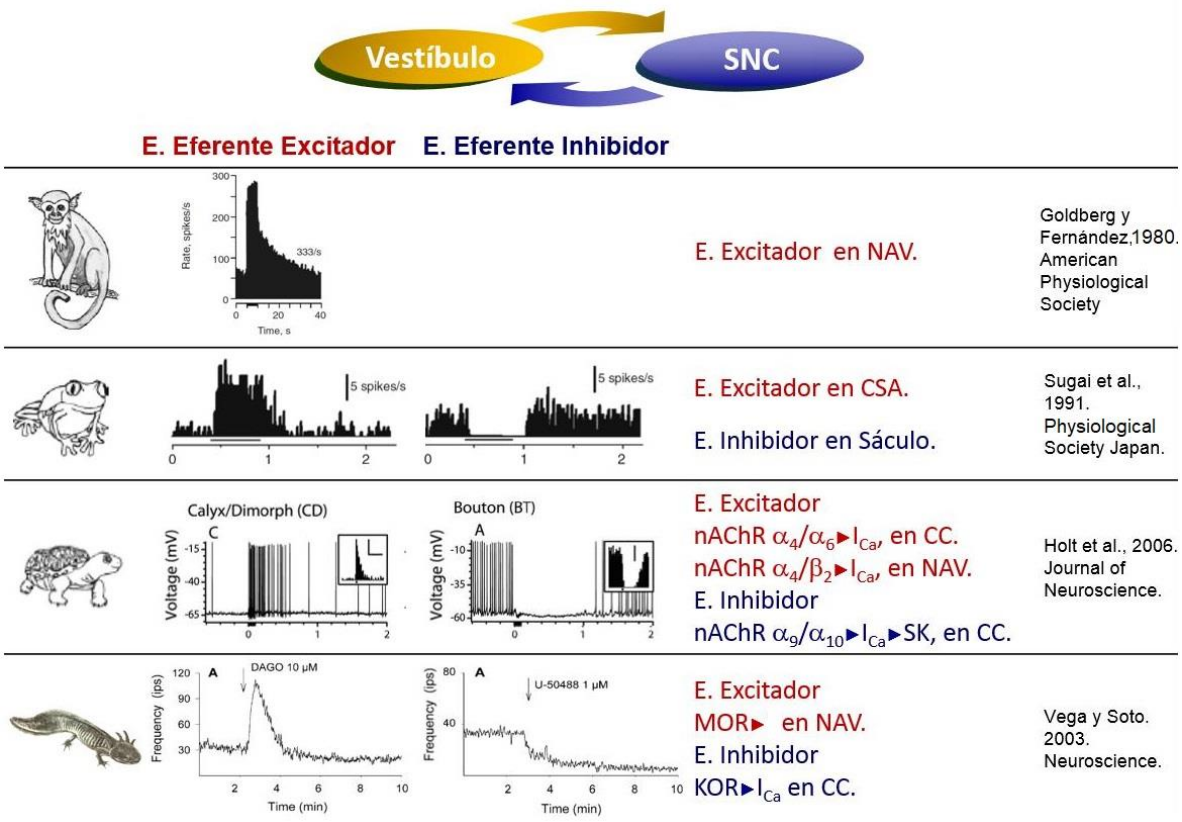


Figura 3. Modulación eferente del sistema vestibular. La activación del sistema eferente produce en las NAV respuestas tanto inhibitorias como excitatorias. En el mono ardilla produce respuestas excitatorias, en el sáculo del sapo produce sólo respuestas inhibitorias y tanto respuestas inhibitorias como excitatorias en las demás fibras aferentes. En la tortuga las respuestas excitatorias son producidas en fibras aferentes caliciformes y dimórficas y respuestas inhibitorias en las fibras aferentes con sinapsis en forma de botón. En el axolotl se producen respuestas exitatorias por activación del receptor MOR en las NAV, y respuestas inhibitorias mediadas por KOR en las células ciliadas.

El sistema eferente tiene efectos excitatorios e inhibitorios sobre la aferencia vestibular los cuales varían según especie y área inervada (Figura 3). En el mono ardilla la activación del sistema eferente vestibular produce respuestas excitatorias en las NAV que inervan los cinco órganos sensoriales con menos del 1% de fibras aferentes teniendo una respuesta inhibitoria (Goldberg y Fernández, 1980), en el sapo *Bufo vulgaris japonicus*, la estimulación de fibras eferentes divergentes produce tanto respuestas excitatorias como inhibitorias, excepto en la rama sacular donde sólo produce respuestas inhibitorias (Sugai y cols., 1991), en *Trachemys scripta elegans* las respuestas excitatorias a la activación eferente se

presentaron en aferentes que presentan sinapsis caliciformes y las NAV con sinapsis en forma de botón presentaron respuestas inhibitorias (Holt y cols., 2006), en *Ambystoma tigrinum* los receptores opioides MOR participan en una modulación excitatoria postsináptica en aferentes vestibulares y receptores KOR en una modulación inhibitoria presináptica (Vega y Soto, 2003).

El neurotransmisor predominante del sistema vestibular eferente es la acetilcolina (Leijon y Magnusson, 2014). También participan el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, péptidos opioides (las fibras aferentes poseen receptores tipo MOR y KOR), GABA y óxido nítrico (Holt, Lysakowski y Goldberg, 2010). Entre las moléculas moduladoras también está el péptido de la nociceptina/orfanina FQ (N/O FQ) y su receptor (NOP) quienes se expresan en los núcleos vestibulares del tallo cerebral (Awwad y cols., 2016). Aunque no se ha demostrado que el sistema eferente libere N/O FQ en el vestíbulo, resulta lógico inferir que esto ocurre pues el receptor NOP se expresa funcionalmente en las neuronas vestibulares de segundo orden (Sulaiman, 1999) y en las NAV como mostramos en este trabajo.

1.2 Antecedentes específicos

a. Estructura y función del sistema N/O FQ -NOP

La búsqueda de receptores relacionados a los receptores opioides MOR, DOR y KOR por medio de clonación homóloga llevaron a la identificación de un clon que expresaba un receptor acoplado a proteína G, inicialmente conocido como ORL1 o LC132, y después como NOP. Como ningún péptido opioide de entre los conocidos en ese entonces interactuaba con este receptor, se inició la búsqueda de su ligando endógeno (Toll, 2016).

En 1995 dos grupos de trabajo descubrieron de forma simultánea el ligando para el receptor huérfano NOP (conocido también como Orl-1, OP4 o LC132) conformando el primer ejemplo de farmacología reversa. Se identificó entonces la secuencia de 17 aminoácidos: FGGFTGARKSARKLANQ y se la nombró N/O FQ (Lambert, 2008).

El receptor NOP pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G que interactúa con proteínas sensibles e insensibles a toxina pertussis y dispara una serie de eventos de señalización intracelular (Donica, 2013); este último mecanismo ocurre en un marco de tiempo que es considerablemente más largo (varios segundos o más) que el que les toma a los neurotransmisores rápidos de bajo peso molecular que actúan directamente sobre receptores ionotrópicos (milisegundos) (Merighi, 2011).

Tabla 1. Efectos biológicos del sistema N/O FQ-NOP.

Sistema	Efecto
Sistema Nervioso Central	Regulación del dolor, modulación de actividad motriz, actividad similar a ansiolíticos y antidepresivos, estimulación del apetito, efectos sobre memoria y aprendizaje, recompensa y adicción, termorregulación (hipotermia), reducción de motilidad intestinal y contracción estomacal neurogénica, estimula la motilidad (en ratas), inhibe la motilidad (en ratones).
Tracto Respiratorio	Inhibe la broncoconstricción, efecto antitusivo.
Sistema Cardiovascular	Produce hipotensión y bradicardia, antiarrítmico, Aumento de la presión arterial y frecuencia cardiaca, vasodilatación (cerebral y periférica).
Función Renal	Diurético, antinatriurético, inhibe el reflejo de micción.
Sistema Inmune	Modulación inmune, analgesia, inmunosupresión, aumento de permeabilidad vascular ante inflamación.
Sistema Endócrino	Secreción de prolactina y hormona del crecimiento.
Sistema Reproductivo	Regula contractilidad uterina, control neuroendócrino, control de la secreción de hormona liberadora de gonadotropina, facilita la erección.
Sistema musculoesquelético	Facilita lordosis.

(Adaptada de Tariq, 2013)

Posteriormente al hallazgo del receptor NOP y su ligando N/O FQ, se han encontrado múltiples funciones fisiológicas y terapéuticas de este sistema. El receptor NOP está implicado en efectos inhibitorios en el sistema nervioso

autónomo de manera similar a los receptores a opioides clásicos, sin embargo, su actividad dentro del sistema nervioso central puede ser similar u opuesta a la de los opioides (Tariq 2013). La Tabla 1 resume algunos de los efectos biológicos del sistema N/O FQ-NOP.

El receptor NOP se localiza presinápticamente en nervios sensoriales simpáticos y parasimpáticos, de forma similar a los receptores opioides clásicos. También se encuentra postsinápticamente en nervios espinales donde tiene un efecto antinociceptivo por regulación negativa de la acción de la sustancia P (Johnson y Lambert, 2002). La activación del receptor NOP inicia eventos intracelulares similares a los producidos por otros receptores opioides pero sus efectos son opuestos a muchas acciones antinociceptivas de agonistas opiodes clásicos (Donica, 2013). El receptor NOP se ha clasificado por la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica (IUPHAR) como un receptor no-opioide dentro de la familia de receptores opioides porque comparte rasgos estructurales y de ubicación con los receptores opioides clásicos; sin embargo, su actividad es insensible al antagonista opioide Naloxona (Lambert, 2008).

El sistema N/O FQ-NOP se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central de mamíferos como la rata (Anton, 1996; Neal, 1999) y el perro (Johnson, 2003), reportes de su mecanismo celular indican que la activación del receptor NOP inhibe canales de calcio y abre canales de potasio rectificadores de entrada lo cual produce hiperpolarización y dificulta el disparo o propagación de potenciales de acción (Donica, 2013).

b. Sistema N/O FQ – NOP en el sistema vestibular

Por medio de estudios de inmunohistoquímica se han localizado en los núcleos vestibulares del tallo cerebral tanto N/O FQ (Neal, 1999) como al receptor NOP (Anton, 1996). Se ha descrito el efecto inhibitorio de N/O FQ sobre la descarga de neuronas del núcleo vestibular medial (Sulaiman y cols., 1999) y se ha reportado

un incremento en los niveles de N/O FQ en los núcleos vestibulares ante lesiones ablativas (Awwad y cols., 2016). Además, previamente en el laboratorio se ha comprobado la expresión funcional de receptores NOP en NAV en cultivo, donde su activación modula de forma selectiva la corriente de calcio tipo N (*Póster* Seseña y cols., 2016).

La entrada aferente a los núcleos vestibulares es un proceso altamente regulado; señales somatosensoriales, propioceptivas, visuales y motoras también son integradas en los núcleos vestibulares (Cullen, 2012). Estas señales son moduladas molecularmente por una red compleja que incluye sustancias neurotransmisoras (Holt y cols., 2011; Soto, 2013). La discriminación entre aceleraciones de la cabeza producidas por el mismo individuo o por condiciones externas es mediada por modulación negativa sobre la entrada aferente hacia los núcleos vestibulares (Angelaki y Cullen, 2008).

De forma experimental se ha observado que la aplicación de N/O FQ inhibe la descarga de potenciales de acción de neuronas del núcleo vestibular medial (Sulaiman y cols., 1999), y su inyección en ratas en estado alerta disminuye la ganancia del reflejo vestíbulo-ocular e incrementa el nistagmo post rotatorio producido en la oscuridad (Sulaiman y cols., 1999).

2. Planteamiento del problema

Se conoce que el sistema vestibular es modulado por el sistema eferente mediante la liberación de sustancias neuromoduladoras entre las cuales se encuentran los péptidos opioides (Soto, 2013). También se sabe que el receptor NOP y su agonista N/O FQ se localizan en los núcleos vestibulares (Neal, 1999; Anton, 1996). Además, se conoce el efecto inhibitorio del sistema NOP-N/O FQ en la descarga de las neuronas del núcleo vestibular medial (Sulaiman, 1999). Lo cual nos hace hipotetizar que este sistema (NOP-N/O FQ) es relevante en la modulación eferente sobre la entrada aferente hacia las neuronas de segundo orden, a la vez que sugiere una diana farmacológica para tratar desordenes

vestibulares. Por lo anterior el presente trabajo pretende determinar el papel funcional del sistema NOP-N/O FQ en la aferencia vestibular.

Previamente en el laboratorio de neurofisiología sensorial se ha estudiado la modulación opioide sobre la actividad aferente vestibular, se ha demostrado que los receptores opioides MOR modulan la actividad AMPA en NAV mejorando su eficacia y KOR modula la actividad de la $I_{K,\ Ca}$ en células ciliadas (Vega y Soto, 2003), además, la activación de MOR inhibe canales de calcio tipo T, L y N en NAV (Seseña y cols., 2014). Así mismo, se ha demostrado que el receptor NOP se encuentra activo en NAV de mamíferos y que éste modula selectivamente la corriente de calcio tipo N mediante el mecanismo dependiente de voltaje (*Póster* Seseña y cols., 2016). Por lo anterior este trabajo es relevante para determinar la influencia que tiene la modulación por activación del receptor NOP sobre los potenciales de acción y la frecuencia de descarga de las NAV.

2.1 Pregunta de investigación

¿Es la activación de receptores NOP por N/O FQ capaz de modular la actividad eléctrica de las NAV de rata en cultivo primario?

3. Hipótesis

La activación del receptor NOP por N/O FQ produce un decremento de la excitabilidad eléctrica en las NAV debido a la inhibición de la corriente de calcio lo que modifica la forma de onda del PA y la descarga repetitiva en las NAV.

4. Justificación

Existen numerosas condiciones que afectan al sistema vestibular en diversas etapas del desarrollo. Las más frecuentes incluyen diversas formas de vértigo, enfermedad de Menière, desórdenes posturales, nistagmo y neuropatía vestibular (Fetter, 2010). Las opciones terapéuticas para desórdenes vestibulares están

limitadas a tratamientos farmacológicos, maniobras de reposicionamiento, liberación quirúrgica de partículas y rehabilitación vestibular (Soto, 2010).

La N/O FQ ha sido reportada como parte de las moléculas, que actúan sobre las aferentes vestibulares (Neal, 1999; Anton, 1996; Sulaiman y cols., 1999). El sistema NOP-N/O FQ puede estar implicado en discernir entre las aceleraciones voluntarias e involuntarias (Cullen, 2004; Angelaki y Cullen, 2008).

Fisiopatológicamente se ha observado que personas y ratas sometidas a ondas de choque desarrollan trastornos vestibulares. En ratas se ha demostrado que con una dosis única de un antagonista del receptor NOP (SB-61211) tras la lesión, se mejora el desempeño vestíbulo-motor además de que se previene la exacerbación del daño por hipoxia cerebral y excitotoxicidad porque inhibe la cascada de señalización que conduce a ellas (Awwad y cols., 2016).

El estudio de N/O FQ y su receptor NOP con técnicas electrofisiológicas aportará información sobre la modulación eferente en la aferencia vestibular y nos permitirá discernir de manera celular y molecular el efecto del sistema NOP-N/O FQ en la fisiología y fisiopatología vestibular.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar la modulación de la excitabilidad de las NAV en cultivo primario por la activación del receptor NOP por N/O FQ.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar por medio de inyección de corriente el efecto de la activación del receptor NOP por su agonista N/O FQ sobre la morfología del PA en las NAV.

2. Definir el efecto de la activación del receptor NOP por su agonista N/O FQ sobre la descarga repetitiva de potenciales de acción producida por inyección de corriente en pulsos rectangulares.
3. Definir el efecto de la activación del receptor NOP por su agonista N/O FQ sobre la descarga dinámica de potenciales de acción producida por estimulación sinusoidal.
4. Determinar si la modulación de la descarga dinámica de potenciales de acción por N/O FQ afecta la regularidad de descarga de las NAV.

6. Materiales y métodos

6.1 Bioética

Todos los procedimientos con animales de laboratorio se realizaron conforme a lo establecido por la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 y el comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) ante el cual este proyecto está registrado con clave SOEE-UALVIEP-18-1.

6.2 Cultivos neuronales

Se usaron ratas Long Evans (cepa C2) neonatales (P7-P10) sin hacer distinción de sexo. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación tras lo cual se expuso la cavidad craneana y se removió el encéfalo. Se realizó la micro disección con ayuda de un microscopio estereoscópico en condiciones de campo estéril dentro de una campana de flujo laminar.

Durante el procedimiento el explante se mantuvo inmerso en medio Leibovitz (Gibco L-15). Se seccionó el nervio óptico en la porción localizada entre las articulaciones anterior y posterior del hueso esfenoides para descubrir el meato auditivo interno donde se encuentran los ganglios vestibular y facial con ubicación lateral y medial respectivamente (Figura 4.A). Con pinzas Dumont #5 de punta recta se fracturó la pared de la cápsula ósea del meato auditivo interno, se resecó

el ganglio vestibular tomándolo de la base y se lo transfirió a una placa Petri de 35 mm con 5 mL de medio Leibovitz (Gibco L-15), se repitió el proceso en el lado opuesto y así sucesivamente en cada una de las cabezas; se utilizaron 3 ratas por cultivo.

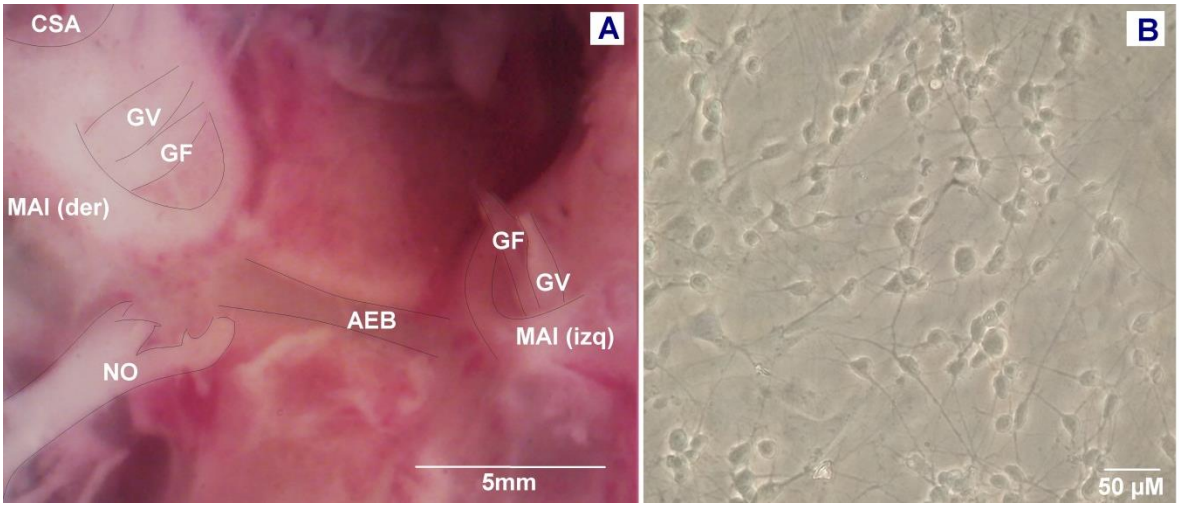


Figura 4. Obtención y cultivo de NAV. A Vista superior de la base del cráneo de la rata durante la microdisección. GV=ganglio vestibular, GF=ganglio facial, MAI=meato auditivo interno, CSA=canal semicircular anterior, NO=nervio óptico (en sección), AEB=articulación esfeno-basilar. **B** NAV en cultivo vistas en un microscopio de contraste de fase después de 24 horas en incubación.

Después los ganglios se tomaron con una pipeta Pasteur de vidrio y se depositaron dentro de un tubo estéril para centrifugación donde fueron sometidos a disociación enzimática por 30 minutos en 2 mL de medio Leibovitz (Gibco L-15) adicionado con tripsina [1.25 mg/mL] y colagenasa tipo 1A [1.25 mg/mL] y posteriormente se sometieron a disociación mecánica con la pipeta Pasteur. Esta suspensión se centrifugó a una velocidad de aproximadamente 4000 rpm durante 5 minutos para separar a las células ganglionares del medio con enzimas el cual fue desechado posteriormente y sustituido por medio Leibovitz (Gibco L-15), el precipitado se resuspendió mecánicamente con una pipeta Pasteur y se centrifugó por segunda vez.

De nuevo se retiró el medio sobrenadante y el precipitado se suspendió en 200 µL de medio Leibovitz (Gibco L-15) suplementado con 10 % de suero bovino de crecimiento (Fetalgro) y adicionado con 1 % de penicilina/estreptomicina

(Antibiótico-antimicótico 100X Gibco), HEPES [15 mM] y $NaHCO_3$ [15 mM]. Las células en suspensión se depositaron de forma gentil sobre cubreobjetos tratados con poli-D-lisina como sustrato de adherencia dentro de cajas Petri de 35 mm. Se permitió que las células se fijasen al sustrato durante 30 minutos tras los cuales se añadieron 3 mL de medio Leibovitz (Gibco L-15) modificado y suplementado.

Los cultivos se incubaron por un lapso de entre 6 a 24 h a 37 ºC (Figura 4.B) con una concentración de CO_2 de 5 % en una estufa de cultivo ThermoFisher.

6.3 Registros electrofisiológicos

a. Soluciones de registro

Para los registros electrofisiológicos se prepararon soluciones que emulan las condiciones de los medios extracelular e intracelular normales con la composición que se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Soluciones de registro.

Solución Extracelular con Isetionato de Na^+ pH ajustado a 7.4 con NaOH		Solución Intracelular con Gluconato de K^+ pH ajustado a 7.2 con NaOH	
Isetionato de Na^+	140 [mM]	Isetionato de Na^+	10 [mM]
Gluconato de K^+	5.4 [mM]	Gluconato de K^+	125 [mM]
$CaCl_2$	1.8 [mM]	$CaCl_2$	0.134 [mM]
$MgCl_2$	1.2 [mM]	EGTA	10 [mM]
HEPES	10 [mM]	HEPES	5 [mM]
Dextrosa	10 [mM]	ATP-Mg^{2+}	1 mg/mL
		GTP-Na^+	0.5mg/mL

El fármaco utilizado como agonista NOP fue N/O FQ (Sigma-Aldrich), a una concentración de [3 µM]. A la solución intracelular se le añadieron DMSO al 0.2 % y Nistatina [400 µM] para hacer el parche perforado. Estos fármacos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

b. Set de registro

El set de registro que se usó consiste de un microscopio invertido de contraste de fase (Nikon Eclipse TS100), un cabezal, y un micromanipulador colocados sobre una mesa antivibratoria dentro de una jaula de Faraday, un amplificador (HEKA EPC 800), un generador de funciones, un sistema de perfusión con controlador de válvulas (Warner VC-6) y posicionador (Warner SF-77B) y un conversor analogico-digital (Molecular Devices Digidata 1550) conectado a una computadora de escritorio con sistema operativo Windows 7. Se empleó el software de registro pClamp 10.4 (Molecular Devices).

Se usaron micropipetas de vidrio con resistencia de entre 2 a 4 MΩ fabricadas a partir de capilares de borosilicato en un estirador láser (Sutter Instruments P-2000).

c. Protocolos de registro

Los registros se realizaron en la configuración de célula completa con parche perforado en las modalidades de fijación de voltaje y fijación de corriente.

Medición de corrientes totales en fijación de voltaje

En la modalidad de fijación de voltaje se aplicó un protocolo de pulsos crecientes rectangulares que inició a -80 mV, tras 5 ms dio un pequeño pulso despolarizante de -75 mV y regresó a -80 mV durante 100 ms tras los cuales pasaron pulsos de 500 ms de duración que partieron de -110 mV con una Δ=10 mV, y al final dió un pulso de -10 mV durante 50 ms como se ve en la Figura 5.

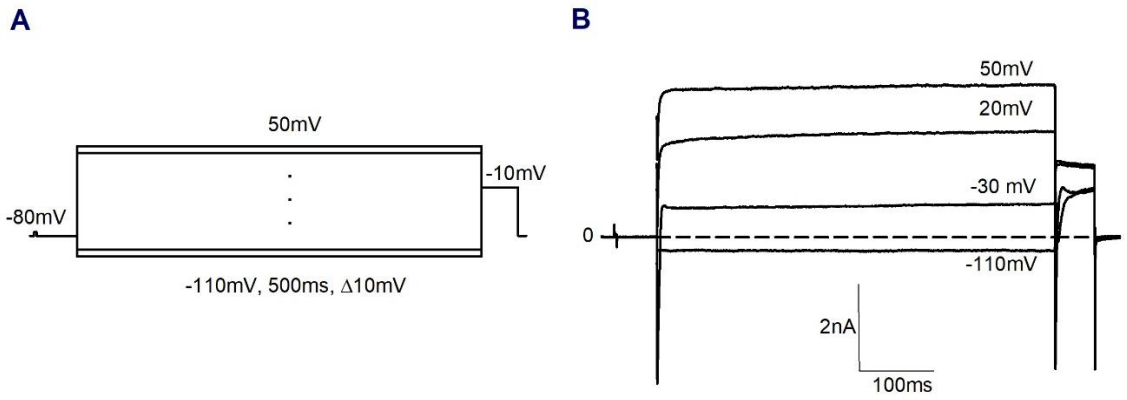


Figura 5. A Protocolo de pulsos crecientes en la modalidad de fijación de voltaje. **B** Trazo resultante donde se aprecian las corrientes entrantes y salientes, la línea punteada representa 0 nA.

Medición de potenciales de acción en fijación de corriente

Para evaluar la excitabilidad neuronal, en la modalidad de fijación de corriente se dieron pulsos rectangulares de inyección de corriente con una duración de 400 ms en un rango de -200 pA a 700 pA con una delta entre pulsos de 50 pA y 4 s entre pulsos. Se usó un voltaje de mantenimiento de -70 mV como se aprecia en la Figura 6. Para estudiar la morfología del PA, se evaluaron los potenciales de acción producidos por el pulso rectangular de 300 pA.

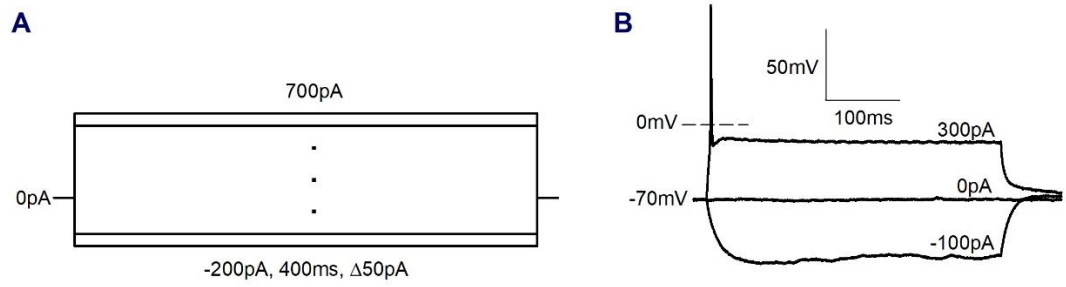


Figura 6. A Protocolo de pulsos crecientes en la modalidad de fijación de corriente. **B** Trazos resultantes donde se aprecia un PA y corriente hiperpolarizante. Algunos trazos se han omitido para tener una imagen más clara.

En todos los protocolos de pulsos crecientes se grabó un registro control, uno con preaplicación sostenida de N/O FQ [3 µM] durante 2 min, y otro tras 2 min de lavado.

Para evaluar la descarga repetitiva dinámica se aplicó estimulación sinusoidal obtenida de un generador de funciones con una frecuencia de 5 Hz y una amplitud de entre 0.2 nA a 1 nA determinada por la amplitud en la cual se produjeran potenciales de acción en aproximadamente el 50% de los ciclos (Figura 7). Se grabaron al menos 30 s con perfusión de solución control, 30 s con aplicación de N/O FQ [3 µM] y 30 s con solución control como lavado.

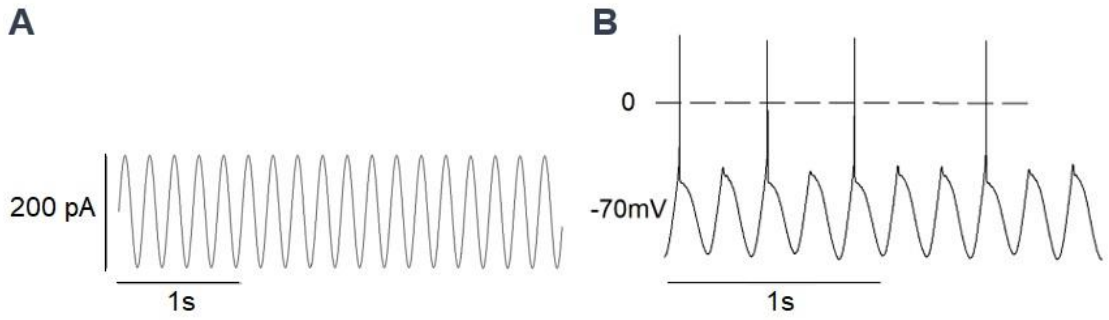


Figura 7. A Protocolo de estimulación con sinusoides. Frecuencia de 5 Hz; Para el caso representado en B la estimulación fue de 200 pA. **B** Trazo resultante con disparos de potenciales de acción, la línea punteada representa el VM de 0.

d. Secuencia de registro

Para realizar el registro electrofisiológico se eligieron células con las siguientes características ópticas en comparación con las células circundantes: mayor refringencia de la membrana, forma esférica y disposición menos distendida. Estas características son propias de las NAV en cultivo (Figura 4.B). Después la micropipeta llena de solución intracelular se acercó hasta tocar la membrana de la neurona. Una vez que se formó un giga-sello (un sello donde la resistencia sea ≥1 GΩ) se aplicó presión negativa para que la membrana se fusionara con el interior de la punta de la micropipeta y se esperó a que se formaran los poros. Se consideraron los siguientes parámetros antes de proseguir con el experimento:

que la resistencia de acceso sea ~10 MΩ y que se observara su corriente entrante al ejecutar el protocolo de fijación de voltaje de pulsos crecientes.
Posteriormente se hizo la transición a la modalidad de fijación de corriente donde se inyectaron pulsos rectangulares de corriente. Se grabó un control, se perfundió N/O FQ [3 µM] durante 2 min y se repitió el protocolo. Al finalizar el protocolo de pulsos crecientes se perfundió a la célula con solución extracelular normal durante 2 min adicionales y se grabó el lavado.

Se prosiguió estimulando a la célula en la modalidad de fijación de corriente con un generador de funciones el cual se usó para inyectar una señal de corriente sinusoidal con una frecuencia de 5 Hz. Se hicieron ajustes en la amplitud del estímulo para obtener cerca de un PA por cada 2 crestas. Como en los casos anteriores se grabaron 1 min de control, 2 min con N/O FQ [3 µM] y 2 min de lavado.

Se realizó un control negativo bloqueando la vía de señalización por medio de la aplicación de GDP-β-s [0.1 mM] a través de la solución intracelular. Se hicieron registros en modalidad de célula completa con parche abierto y se utilizaron los mismos protocolos de estimulación antes mencionados.

6.4 Análisis

Los parámetros respecto a las propiedades pasivas de la membrana que fueron medidos en cada registro son: capacitancia de membrana que nos da una idea relativa de la superficie de la membrana, resistencia de membrana, resistencia de acceso, constante de tiempo de membrana (tau), y voltaje de membrana.

Los parámetros del PA que fueron analizados son: amplitud (distancia desde el potencial de membrana en reposo hasta el pico del PA), latencia (lapso que transcurre desde el inicio del pulso hasta que el PA alcanza su despolarización máxima), duración al 50 % (tiempo que transcurre durante la fase

Tabla 3. Unidades de medida para las variables consideradas.

Variable	Unidad de medida
Capacitancia de membrana (Cm)	Picofaradios (pF)
Resistencia de membrana (Rm)	Mega Ohms (MΩ)
Resistencia de acceso (Ra)	Mega Ohms (MΩ)
Tau (τ)	Microsegundos (µs)
Voltaje de membrana (Vm)	Milivolts (mV)
Amplitud del PA	Milivolts (mV)
Latencia	Milisegundos (ms)
Duración al 50%	Milisegundos (ms)
Tasa máxima de despolarización (TMD)	Δ mV/ms
Tasa máxima de repolarización (TMR)	Δ mV/ms
Umbral	Milivolts (mV)
Número de potenciales de acción	Número

de repolarización desde la amplitud máxima hasta el 50 % de la amplitud al pico), tasa máxima de despolarización (pendiente con la que cambia el voltaje de membrana en la fase ascendente del PA), tasa máxima de repolarización (pendiente con la que cambia el voltaje de membrana en la fase descendente del PA) y umbral (potencial de membrana en el cual la primera derivada de voltaje contra tiempo es > 1.98 veces mayor que la desviación estándar del voltaje de membrana de los 10 µs anteriores y las derivadas subsecuentes son mayores) (Tabla 3, Figura 8).

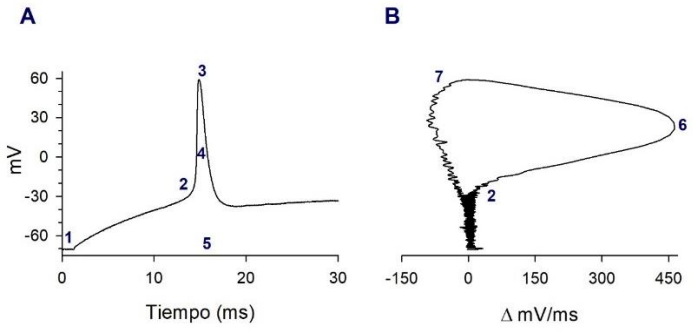


Figura 8. Medición de parámetros del PA. 1) Potencial de membrana en reposo; 2) umbral; 3) amplitud del PA; 4) duración al 50%; 5) latencia al pico; 6) TMD; 7) TMR. **A** Potencial de acción de una NAV. **B** Diagrama de fases del mismo potencial de acción donde el eje x representa la razón de cambio del voltaje con respecto al tiempo y el eje y el VM.

6.5 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño de bloques; un bloque fue el control, otro bloque el registro con aplicación de N/O FQ y el tercer bloque el registro en condiciones de lavado. En los registros de fijación de corriente las variables independientes fueron la presencia de N/O FQ, la estimulación eléctrica y el potencial de membrana.

Se realizó un histograma de capacitancias de todas las neuronas registradas para determinar el tipo de distribución que presentaban y si se trataba de una distribución normal.

La significancia de los parámetros se determinó aplicando la prueba estadística *t* de Student pareada con un valor de $\alpha = 0.05$ siendo la hipótesis nula que la aplicación de N/O FQ no tiene efecto alguno sobre los parámetros de capacitancia, amplitud, latencia al pico, duración al 50 %, tasa máxima de despolarización, tasa máxima de repolarización y valor umbral.

7. Resultados

7.1 Propiedades pasivas de las células registradas

El promedio las células registradas tuvieron las siguientes características: Capacitancia de membrana de 18 ± 2 pF (Figura 9), resistencia de membrana de 371 ± 79 MΩ, Tau de 170 ± 16 µs y potencial de membrana sin estimulación de -57 ± 4 mV como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Propiedades pasivas de las NAV registradas (n = 33).

Cm (pF)	Rm (MΩ)	Ra (MΩ)	Tau (µs)	PM (mV)
18 ± 2	371 ± 79	9 ± 2	170 ± 16	-57 ± 4

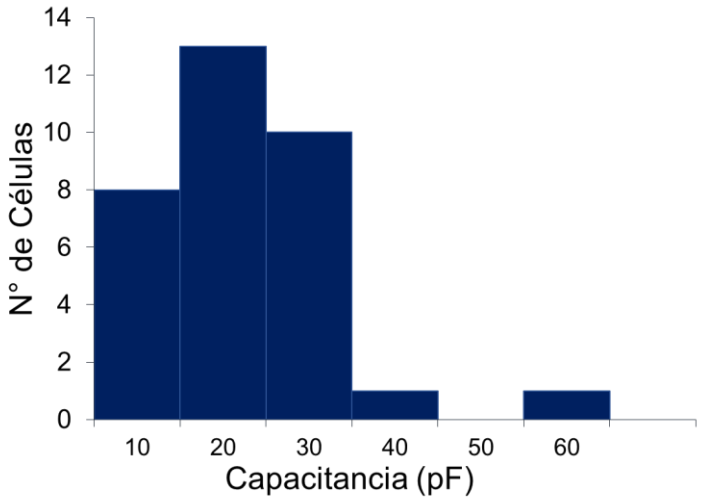


Figura 9. Histograma de capacitancia de las células registradas. La capacitancia de las NAV registradas fue de 18 ± 2 (n=33) y se distribuyeron en un rango de 6-58 pF.

7.2 Modulación del PA por N/O FQ

Evaluar las propiedades electrofisiológicas del PA permite estudiar la interacción de todas las corrientes iónicas presentes (Sull, 2014) y fue el camino que siguieron Clark y colaboradores para determinar el papel de corrientes de potasio en el cambio de morfología del PA de células cardiacas (Clark y cols., 1993).

Tabla 5. Promedio de los parámetros del PA en NAV (n=20).

	VM	Amplitud	Latencia	Duración al 50%	TMD	TMR	Umbral
Control	-73 ± 2	113 ± 4	6.0 ± 0.6	2.1 ± 0.2	315 ± 42	-81 ± 10	-30 ± 2
N/O FQ	-73 ± 2	115 ± 5	6.1 ± 0.5	3.0 ± 0.5	305 ± 38	-68 ± 8	-29 ± 2
Lavado	-73 ± 1	115 ± 5	5.9 ± 0.5	2.7 ± 0.4	306 ± 49	-76 ± 11	-25 ± 1
P	0.33	0.09	0.40	0.04 *	0.14	0.008 **	0.22

La activación del receptor NOP por N/O FQ [3 µM] en NAV en cultivo produjo una disminución significativa en la tasa máxima de repolarización desplazándola de -81 ± 10 mV/ms a -68 ± 8 mV/ms con una recuperación al 94 % en el lavado (n = 20, P = 0.007) (Figura 10) y un aumento en la duración al 50 % de 3 ± 1 ms a 4 ± 1

ms (n = 20, P = 0.039). El resto de los parámetros medidos en el PA no se modificaron significativamente como se muestra en la Tabla 5.

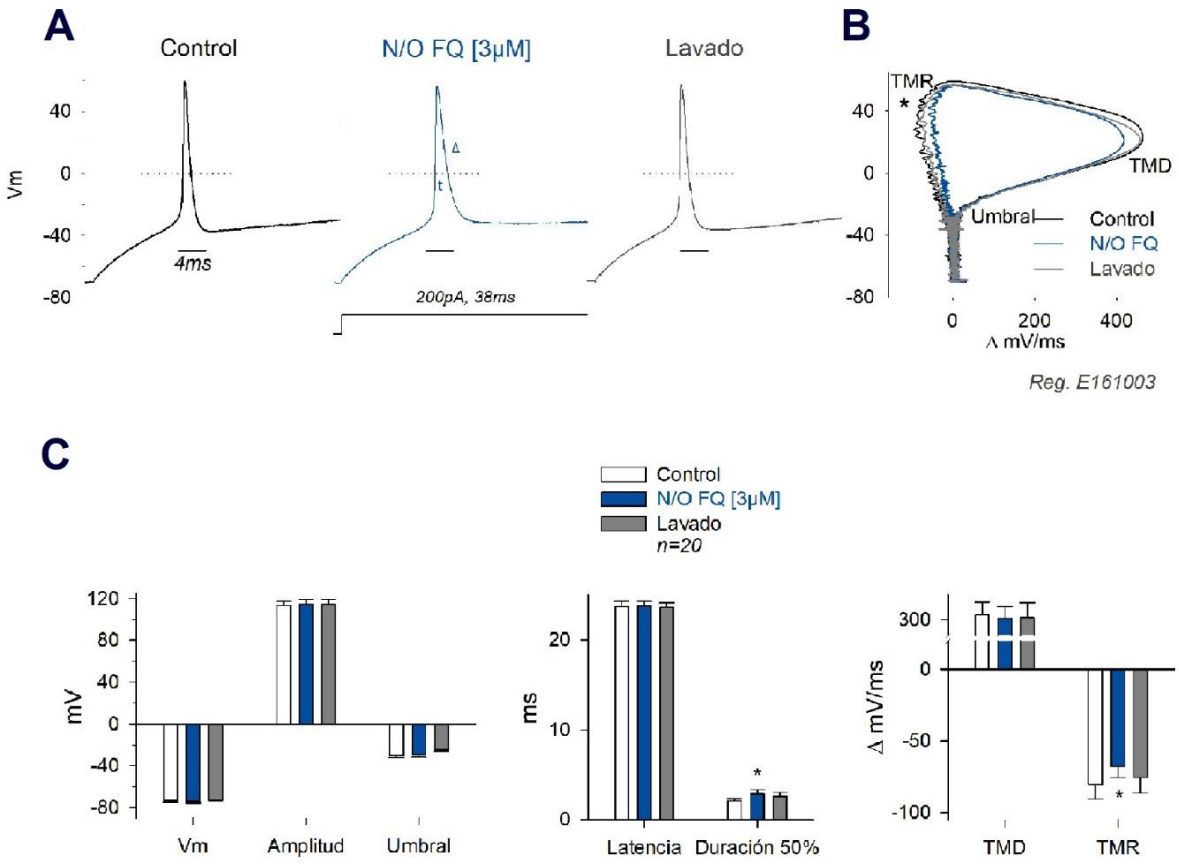


Figura 10. La activación del receptor NOP por N/O FQ disminuye la tasa máxima de repolarización y aumenta la duración al 50 % en el PA de NAV. A Registro de célula completa en modalidad de fijación de corriente; la fase descendente del PA tiene una pendiente menor con la aplicación de N/O FQ. No se observan cambios significativos en la velocidad de despolarización ni en la amplitud del PA; τ = duración al 50 %; Δ = TMR; la línea punteada representa el VM de 0. **B** Diagrama de fases donde se aprecia el VM en el cual se encuentra el umbral y al cual se alcanzan la TMD y la TMR. **C** Promedio de los parámetros del PA de las NAV registradas. La aplicación de N/O FQ aumenta la duración al 50 % y disminuye la tasa máxima de repolarización sin afectar los demás parámetros.

7.3 Efecto sobre la descarga repetitiva

Algunas de las células registradas presentaron descarga repetitiva (5/20). En éstas el número de potenciales de acción disminuyó de forma significativa en un 46.6 % con la aplicación de N/O FQ [3 µM] (P = 0.002) y una recuperación al 73.3 % en el lavado como se ve en la tabla 6 y la figura 11.

Tabla 6. Promedio del número de potenciales de acción en NAV con estimulación con pulsos cuadrados y aplicación de N/O FQ.

	Control	N/O FQ [3 µM]	Lavado
N de PA	3 ± 0.3	1.6 ± 0.2	2.2 ± 0.2

n = 5 P = 0.002

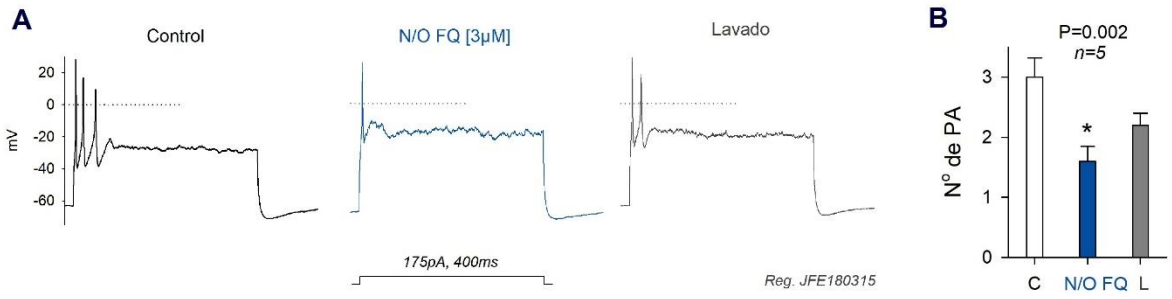


Figura 11. N/O FQ disminuye el número de potenciales de acción en NAV que presentan descarga repetitiva. A Efecto de N/O FQ [3 µM] sobre la descarga repetitiva en NAV. Registro en modalidad de fijación de corriente, se muestra el trazo con un estímulo de 175 pA. La línea punteada representa el VM de 0. **B** Gráfica de barras del promedio del número de potenciales de acción en NAV con descarga repetitiva en control, con N/O FQ [3 µM] y lavado.

7.4 Efecto sobre la descarga dinámica

En las células con estimulación sinusoidal (n = 11) la aplicación de N/O FQ [3 µM] redujo el número de PA por ciclo en un 34 % (de 0.38 ± 0.07 a 0.25 ± 0.06) con una significancia estadística de P = 0.004 como se muestra en la figura 12. El análisis del coeficiente de variación indica que N/O FQ [3 µM] no afecta la regularidad de descarga de NAV (P = 0.29). La figura 13 muestra el trazo de una de las células registradas.

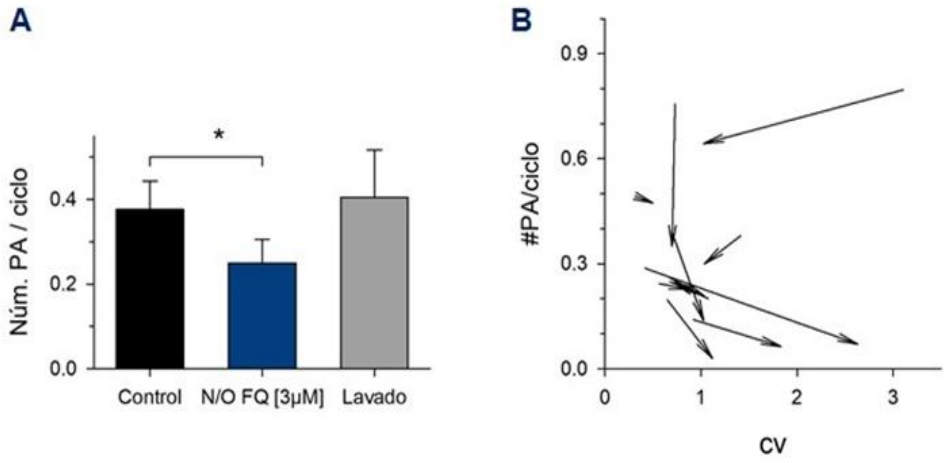


Figura 12. Efecto de la aplicación de N/O FQ en NAV con estimulación sinusoidal. A N/O FQ [3 µM] disminuye la frecuencia de disparo por ciclo en NAV con estimulación senoidal. **B** N/O FQ [3 µM] no afecta la regularidad de descarga en NAV. Cada vector representa una célula registrada; el punto en el origen representa el valor control y el punto en el extremo el valor con N/O FQ [3 µM].

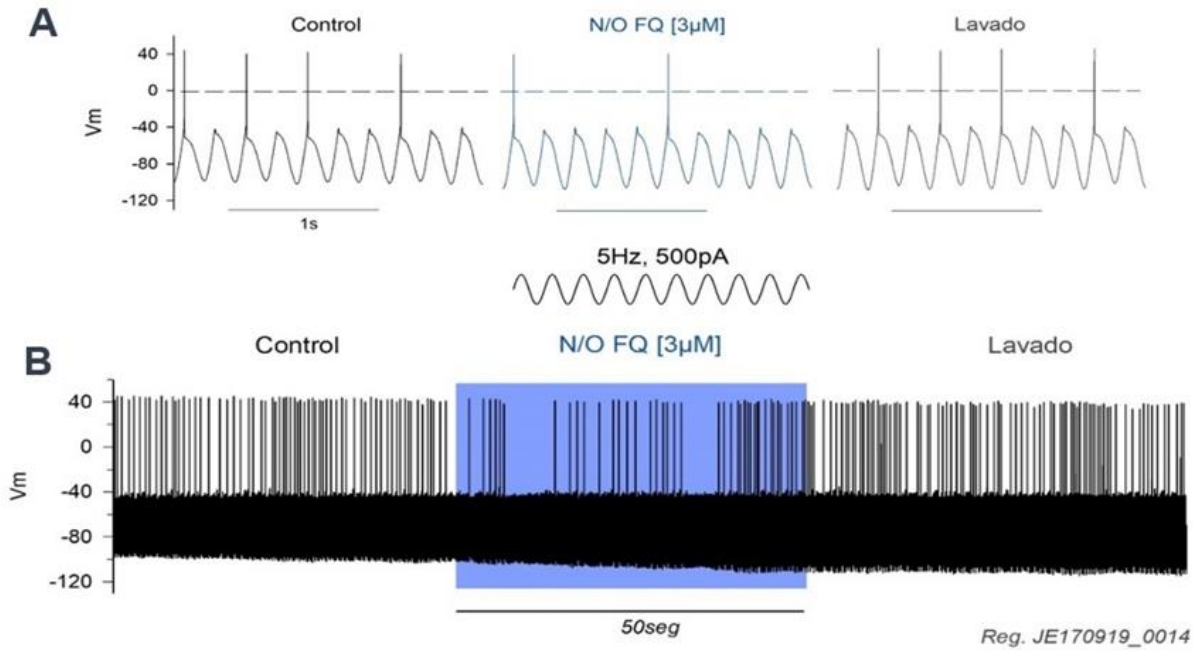


Figura 13. La aplicación de N/O FQ disminuye la frecuencia de descarga en NAV. A Ampliación de una selección del trazo, la línea punteada representa el VM en 0, el estímulo está representado en la onda sinusoidal en la parte inferior. **B** Registro completo, el área sombreada corresponde a la aplicación de N/O FQ [3 µM]. Esta célula fue estimulada a 5 Hz de frecuencia con 500 pA de amplitud.

7.5 Evaluación del efecto de N/O FQ con bloqueo de la proteína Gβγ

Modulación del PA

Al coaplicar GDP-β-s con N/O FQ [3 µM] no se observaron cambios significativos en los parámetros del PA ni en su forma como se muestra en la Figura 14. y en la Tabla 7 (n=13).

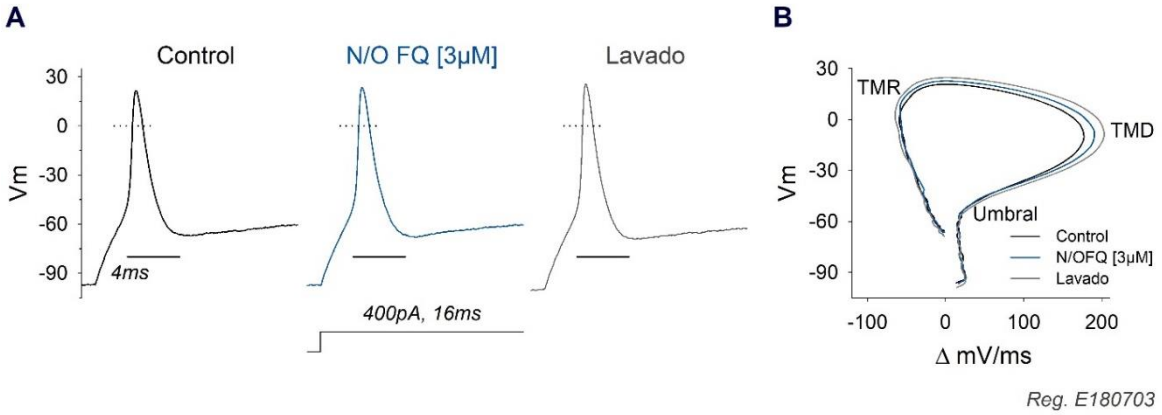


Figura 14. GDP-β-s bloquea el efecto de N/O FQ sobre el PA de NAV. A Registro de célula completa en modalidad de fijación de corriente. **B** Diagrama de fases que muestra la razón de cambio de voltaje contra tiempo contra el potencial de membrana de la célula. Las diferencias entre condiciones no son estadísticamente significativas.

Tabla 7. Promedio de los parámetros del PA en NAV con GDP-β-s intracelular (n=13).

	VM	Amplitud	Latencia	Duración al 50%	TMD	TMR	Umbral
Control	-75 ± 4	107 ± 5	23 ± 0.4	2.7 ± 0.5	260 ± 24	-93 ± 5	-31 ± 3
N/O FQ	-74 ± 3	105 ± 6	22 ± 0.4	2.8 ± 0.5	265 ± 25	-83 ± 6	-30 ± 4
Lavado	-75 ± 3	106 ± 6	23 ± 0.5	2.5 ± 0.3	262 ± 25	-86 ± 5	-32 ± 4
P	0.23	0.54	0.08	0.18	0.75	0.49	0.6

Efecto sobre la descarga repetitiva

Al coaplicar GDP-β-s, el número de PA no disminuyó como cuando se aplicó solamente N/O FQ [3 µM]. La Figura 15 muestra un trazo representativo y el promedio de los resultados de las células registradas con GDP-β-s que presentaron descarga repetitiva (n=4).

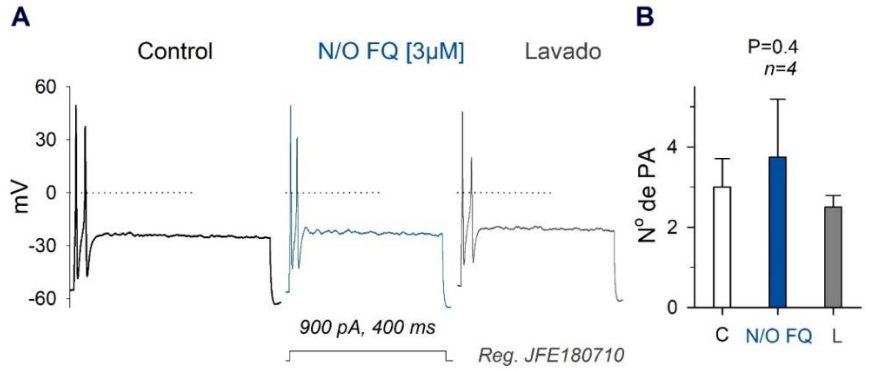


Figura 15. GDP-β-s bloquea el efecto de N/O FQ sobre la descarga repetitiva en NAV. A Trazo representativo de un registro de NAV en fijación de corriente con coaplicación de GDP-β-s y N/O FQ donde se observa que el número se PA no cambia. La línea punteada representa el potencial de membrana = 0. **B** Promedio del número de PA en coaplicación de GDP-β-s y N/O FQ (n=4).

Efecto sobre la descarga dinámica

Cuando se aplicó estimulación sinusoidal con GDP-β-s (n=6), el número de PA por ciclo no disminuyó con la aplicación de N/O FQ [3 µM] (Figura 16.A y Figura 17) y tampoco se afectó la regularidad de descarga como se aprecia en la Figura 15.B.

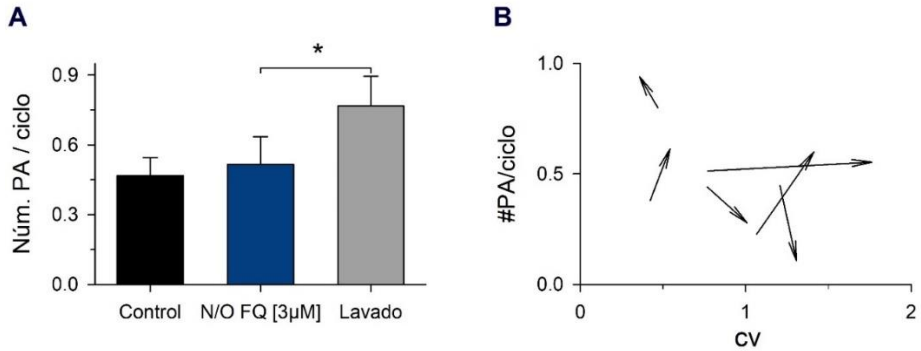


Figura 16. GDP-β-s bloquea el efecto de N/O FQ sobre la descarga dinámica de NAV. A La frecuencia de descarga de NAV con estimulación sinusoidal no disminuye al coaplicar N/O FQ [3 µM] con GDP-β-s. Las barras representan el promedio de los PA por ciclo (n=6). **B** La regularidad de descarga no es afectada. N/O FQ [3 µM] no afecta la regularidad de descarga en NAV. Cada vector representa una célula registrada; el punto en el origen representa los valores del número de PA/ciclo y el coeficiente de varianza en condiciones control y el punto en el extremo los valores al aplicar N/O FQ [3 µM].

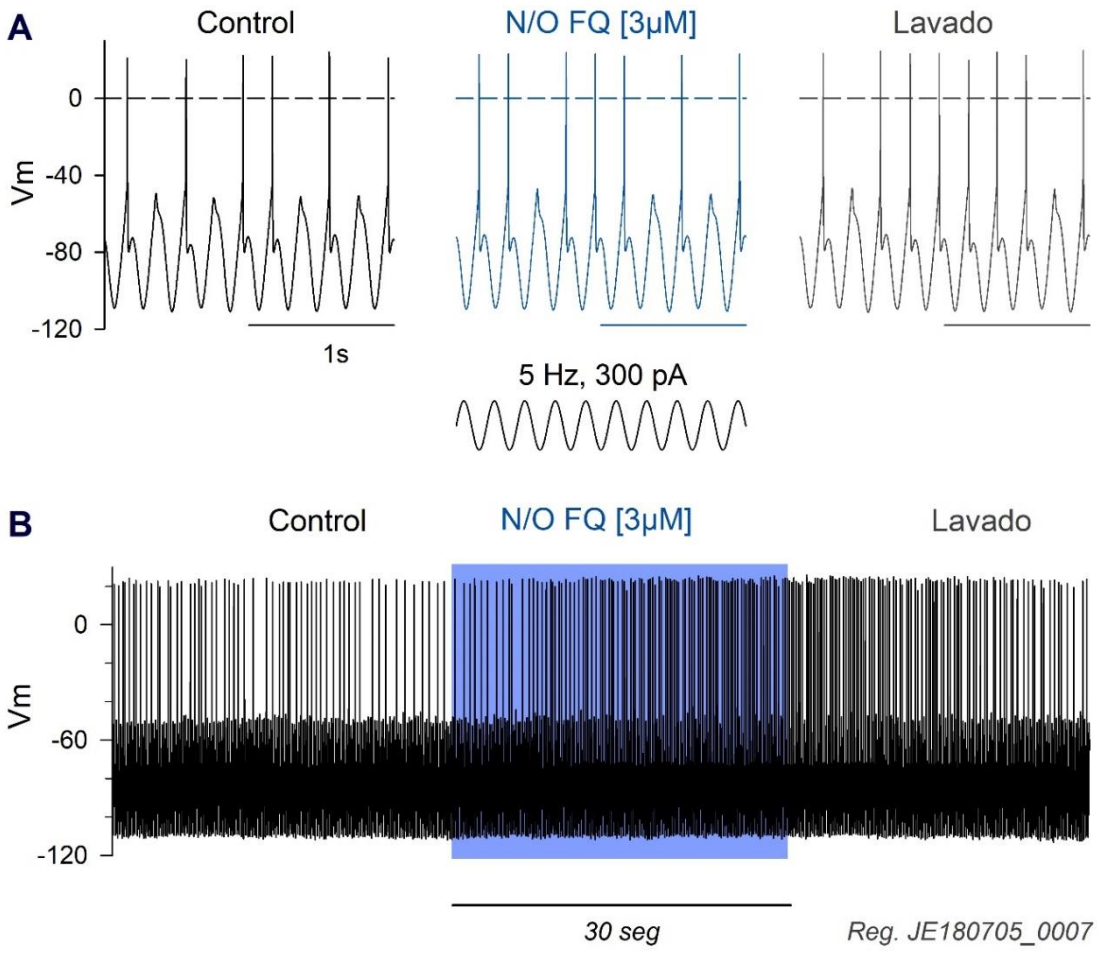


Figura 17. GDP-β-s intracelular evita que la aplicación de N/O FQ disminuya la frecuencia de descarga en NAV. A Ampliación de una selección del trazo, la línea punteada representa el VM en 0, el estímulo está representado en la onda sinusoidal en la parte inferior. **B** Registro completo, el área sombreada corresponde a la aplicación de N/O FQ [3 µM]. Esta célula fue estimulada a 5 Hz de frecuencia con 300 pA de amplitud.

8. Discusión

Se conoce que el sistema N/O FQ-NOP produce efectos diversos en diferentes tejidos (Tariq, 2013; Mogil, Gavril y Paternak, 2001). La heterogeneidad de respuestas se puede explicar por la existencia de diferentes mecanismos de acción para el receptor NOP. La activación de NOP por N/O FQ desencadena una serie de eventos intracelulares que incluyen: inhibición de la adenilato-ciclasa, activación de la proteína cinasa C (PKC), fosfolipasa A y C, ERK 1 y 2, p38 MAP

cinasa, JNK, NFκB, y modula las conductancias de calcio y potasio (Donica, 2013).

El receptor NOP modula la corriente de potasio rectificadora de entrada acoplada a proteína G (GIRK) (Chee y cols., 2011). Además, NOP inhibe la corriente de calcio tipo N de modo dependiente e independiente de voltaje. El mecanismo voltaje dependiente es mediado por la activación de la subunidad $G\alpha_{i/o}$ y de forma específica por la interacción directa de los canales con la subunidad Gβγ (Beedle, 2004) el mecanismo independiente de voltaje consiste en la modulación de los canales de calcio tipo N por medio de mensajeros difusibles como el AMPc; y finalmente se ha descrito un tercer mecanismo de modulación del canal de calcio tipo N por interacción directa con el receptor NOP, en este tercer mecanismo la activación del receptor NOP lleva a la activación de arrestinas que producen la vesiculación del complejo NOP-Canal de calcio N (Altier, 2006).

Nuestros resultados contrastan con lo reportado en neuronas del núcleo ventromedial del tálamo (NVM) en ratones (Chee y cols., 2011) y en neuronas de caracol *Helix aspersa* (León-Olea y cols., 2001), donde la aplicación de N/O FQ causa una hiperpolarización del potencial de membrana en reposo y no modifica la morfología del PA, esto se puede explicar con lo que mencionamos anteriormente y sugiere que los efectos de la activación del sistema N/O FQ-NOP en diferentes modelos se deben a la acción de ciertos mecanismos en particular.

En el caso de neuronas de ratón y de *Helix aspersa*, el efecto hiperpolarizante de la activación del receptor NOP puede deberse a una corriente saliente de potasio (Amano, 2000; Chee y cols., 2011). Para las NAV Seseña, Soto y Vega (2016) demostraron que N/O FQ modula a través del mecanismo dependiente de voltaje a corrientes de calcio tipo N cuya presencia está demostrada en estas neuronas (Desmadryl y cols., 1997). Resultados adicionales en nuestro laboratorio muestran que la aplicación de N/O FQ *in vitro,* no afecta la corriente GIRK de NAV de rata.

Como mencionamos anteriormente, la activación de NOP inhibe selectivamente a la corriente de calcio tipo N en las NAV, teniendo en cuenta que la corriente de

calcio tipo N corresponde aproximadamente al 30 % de la corriente HVA (Desmadryl y cols., 1997; Seseña y cols., 2013), su modulación no es suficiente para explicar cambios en la duración del PA ni en la TMR. Sin embargo, estos hallazgos concuerdan con lo que se conoce sobre cómo la corriente de calcio puede afectar de forma secundaria a la corriente de potasio dependiente de calcio la cual juega un papel importante en controlar la morfología del PA y regular la excitabilidad neuronal (Ashcroft, 2000), tal como en el caso de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (Iyer, Ungless y Faisal, 2017) y en NAV se ha observado que la inhibición de la I_{Ca} por otros péptidos opioides causa una disminución en la amplitud de la corriente de potasio dependiente de calcio ($I_{K, Ca}$) (Seseña y cols., 2014) cuya presencia en estas neuronas había sido demostrada por Limón y cols. (2005). También podría estar involucrada la corriente de cloro dependiente de calcio que participa en la modulación de la actividad de neuronas del ganglio de la raíz dorsal en la rata (Huang y cols. 2013) pero no ha sido estudiada en NAV.

Cuando agregamos GDP-β-s a la solución intracelular no encontramos ninguna respuesta ante la aplicación de N/O FQ. Esto ocurre porque el receptor NOP es un receptor acoplado a proteína G_i/G_0 (Hawes y cols. 2000) y GDP-β-s mantiene a dichas proteínas en estado inactivo (Lutz, 2002), incluso es posible que la inhibición de la proteína Gi por GDP-β-s estimule la actividad basal de la adenilato-ciclasa al liberarla de la inhibición por Gi (Piacentini y cols., 1996). Con esto nos aseguramos de que los cambios que observamos se debieron a la activación de NOP por N/O FQ, ya que al bloquear su vía de señalización dejamos de ver su efecto.

9. Conclusiones

La activación del receptor NOP por N/O FQ modifica la morfología del PA en NAV por medio de una disminución de la tasa máxima de repolarización y un aumento de la duración al 50 %.

También reduce el número de potenciales de acción en las NAV con descarga repetitiva y disminuye la frecuencia de disparo en la descarga dinámica evocada por estimulación sinusoidal.

La inhibición de la proteína Gi por GDP-β-s bloquea el efecto de N/O FQ sobre el PA, la descarga repetitiva y la descarga dinámica en las NAV.

El decremento en la frecuencia de descarga de aferentes vestibulares por la activación de NOP por N/O FQ sugiere que este sistema modula negativamente la liberación de neurotransmisor hacia las neuronas de segundo orden. Esta modulación de la entrada aferente vestibular puede estar involucrada en la discriminación entre cambios de posición voluntarios e involuntarios (Angelaki y Cullen, 2008) y participar en la respuesta a lesiones vestibulares (Awwad y cols., 2016).

10. Referencias

Altier, C., Khosravani, H., Evans, R. M., Hameed, S., Peloquin, J. B., Vartian, B. A., Dubel, S. J. (2006). ORL1 receptor–mediated internalization of N-type calcium channels. Nature neuroscience, 9(1), 31.

Amano, T., Matsubayashi, H., Tamura, Y., Takahashi, T. (2000). Orphanin FQ-induced outward current in rat hippocampus. Brain Research, 853(2), 269-274.

Angelaki, D. E., Cullen, K. E. (2008). Vestibular system: the many facets of a multimodal sense. Annu. Rev. Neurosci., 31, 125-150.

Anton, B., Fein, J., To, T., Li, X., Silberstein, L., Evans, C. J. (1996). Immunohistochemical localization of ORL-1 in the central nervous system of the rat. Journal of Comparative Neurology, 368(2), 229-251.

Ashcroft, F. M. (1999). Ion channels and disease. Academic press.

Autret, L., Mechaly, I., Scamps, F., Valmier, J., Lory, P., Desmadryl, G. (2005). The involvement of Cav3. 2/α1H T-type calcium channels in excitability of mouse embryonic primary vestibular neurones. The Journal of physiology, 567(1), 67-78.

Awwad, H. O., Durand, C. D., Gonzalez, L. P., Tompkins, P., Zhang, Y., Lerner, M. R., ... Standifer, K. M. (2016). Post-blast treatment with Nociceptin/Orphanin FQ peptide (NOP) receptor antagonist reduces brain injury-induced hypoxia and signaling proteins in vestibulomotor-related brain regions. Behavioural Brain Research, pp. 30918-4. DOI: 10.1016/j.bbr.2016.10.041.

Beedle, A. M., McRory, J. E., Poirot, O., Doering, C. J., Altier, C., Barrere, C., ... Zamponi, G. W. (2004). Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. Nature neuroscience, 7(2), 118.

Beisel, K. W., Wang-Lundberg, Y., Maklad, A., Fritzsch, B. (2005). Development and evolution of the vestibular sensory apparatus of the mammalian ear. Journal of Vestibular Research, 15(5, 6), 225-241.

Bernard, C., Ferrary, E., Sterkers, O. (1986). Production of endolymph in the semicircular canal of the frog Rana esculenta. Journal of Physiology, 371(1), 17-28.

Cervantes, B., Vega, R., Limon, A., Soto, E. (2013). Identity, expression and functional role of the sodium-activated potassium current in vestibular ganglion afferent neurons. Neuroscience, 240, 163-175.

Chee, M. J., Price, C. J., Statnick, M. A., Colmers, W. F. (2011). Nociceptin/orphanin FQ suppresses the excitability of neurons in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. Journal of Physiology, 589(13), 3103-3114.

Clark, R. B., Bouchard, R. A., Salinas-Stefanon, E., Sanchez-Chapula, J., Giles, W. R. (1993). Heterogeneity of action potential waveforms and potassium currents in rat ventricle. Cardiovascular Research, 27(10), 1795-1799.

Corey, D. P., Holt, J. R. (2016). Are TMCs the mechanotransduction channels of vertebrate hair cells? Journal of Neuroscience, 36(43), 10921-10926.

Cortes, C., Galindo, F., Galicia, S., Cebada, J., Flores, A. (2013). Excitatory actions of GABA in developing chick vestibular afferents: effects on resting electrical activity. Synapse, 67, 374-381.

Cullen, K. E. (2004). Sensory signals during active versus passive movement. Current Opinion in Neurobiology, 14(6), 698-706.

Cullen, K. E. (2012). The vestibular system: multimodal integration and encoding of self-motion for motor control. Trends in Neurosciences, 35(3), 185-196.

Cullen, K. E., Roy, J. E. (2004). Signal processing in the vestibular system during active versus passive head movements. Journal of Neurophysiology, 91(5), 1919-1933.

Cullen, K., Sadeghi, S. (2008). Vestibular system. Scholarpedia, 3(1), 3013.

Desmadryl, G., Chambard, J. M., Valmier, J., Sans, A. (1997). Multiple voltage-dependent calcium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. Neuroscience, 78(2), 511-522.

Haines, D. E. (2012). Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications E-Book: with STUDENT CONSULT Online Access. Elsevier Health Sciences.

Donica, C. L., Awwad, H. O., Thakker, D. R., Standifer, K. M. (2013). Cellular mechanisms of nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) peptide (NOP) receptor regulation and heterologous regulation by N/OFQ. Molecular Pharmacology, 83(5), 907-918.

Eatock, R. A. (2008). How do specializations of vestibular hair cells and primary afferent neurons shape vestibular signals? Equilibrium Research, 67(5), 363-488. doi:10.3757/jser.67.363.

Eatock, R. A., Hurley, K. M. (2003). Functional development of hair cells. Current Topics Developmental Biology, 57, 389-448.

Eatock, R. A., Songer, J. E. (2011). Vestibular hair cells and afferents: two channels for head motion signals. Annual Review of Neuroscience, 34, 501-534.

Fetter, M. (2010). Vestibular System Disorders. Encyclopedia of Life Sciences. Obtenido de: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0002213.pub2.

Goldberg, J. M. (2000). Afferent diversity and the organization of central vestibular pathways. Experimental Brain Research, 130(3), 277-297

Goldberg, J. M. (2014). The Implications of Discharge Regularity: My Forty-Year Peek into the Vestibular System. In Perspectives on Auditory Research (pp. 183-209). Springer New York.

Goldberg, J. M., Fernandez, C. (1980). Efferent vestibular system in the squirrel monkey: anatomical location and influence on afferent activity. Journal of Neurophysiology, 43(4), 986-1025.

Goldberg ME, Walker MF, Hudspeth AJ. The vestibular system. In: Kandel EK, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, editors. Principles of Neural Science. New York, NY, USA: McGraw-Hill; 2013. pp. 917–934.

Hain, T. C., Helminski, J. O. (2014). Physiology of the vestibular system. In" Vestibular Rehabilitation (Doctoral dissertation, Ed. S. Herdman).

Holt, J. C., Lysakowski, A., Goldberg, J. M. (2006). Mechanisms of efferent-mediated responses in the turtle posterior crista. The Journal of Neuroscience, 26(51), 13180-13193.

Holt, J. C., Lysakowski, A., Goldberg, J. M. (2011). The efferent vestibular system. In Auditory and Vestibular Efferents (pp. 135-186). Springer New York.

Huang, F., Wang, X., Ostertag, E. M., Nuwal, T., Huang, B., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (2013). TMEM16C facilitates Na+-activated K+ currents in rat sensory neurons and regulates pain processing. Nature neuroscience, 16(9), 1284.

Hudspeth, AJ. The inner ear. In: Kandel EK, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, editors. Principles of Neural Science. New York, NY, USA: McGraw-Hill; 2013. pp. 654–681.

Ishibashi, T., Takumida, M., Akagi, N., Hirakawa, K., Anniko, M. (2009). Changes in transient receptor potential vanilloid (TRPV) 1, 2, 3 and 4 expression in mouse inner ear following gentamicin challenge. Acta oto-laryngologica, 129(2), 116-126.

Iwasaki, S., Chihara, Y., Komuta, Y., Ito, K., Sahara, Y. (2008). Low-voltage-activated potassium channels underlie the regulation of intrinsic firing properties of rat vestibular ganglion cells. Journal of Neurophysiology, 100, 2192-2204.

Iyer, R., Ungless, M. A., Faisal, A. A. (2017). Calcium-activated SK channels control firing regularity by modulating sodium channel availability in midbrain dopamine neurons. Scientific reports, 7(1), 5248.

Johnson, E. E., Lambert, D. G. (2002). Molecular pharmacology of the opioid/nociceptin system. Current Anaesthesia and Critical Care, 13(6), 305-312.

Johnson, E. E. (2003). Anatomical localisation and functional coupling of the nociceptin receptor in dog brain (Doctoral dissertation, Medicine). University of Leicester.

Kalluri, R., Xue, J., Eatock, R. A. (2010). Ion channels set spike timing regularity of mammalian vestibular afferent neurons. Journal of Neurophysiology, 104(4), 2034-2051.

Kandel, E. R. (2012). Principles of neural science. New York: McGraw-Hill.

Keshner, E. A. (2009). Vestibulocollic and cervicocollic control. In Encyclopedia of Neuroscience (pp. 4220-4224). Springer Berlin Heidelberg.

Khan, S., Chang, R. (2013). Anatomy of the vestibular system: a review. NeuroRehabilitation, 32(3), 437-443.

Khorevin, V. I. (2008) The lagena (the third otolith endorgan in vertebrates. Journal of Neurophysiology, 40 (2), 142-159.

Kitahara, T., Li, H. S., Balaban, C. D. (2005). Changes in transient receptor potential cation channel superfamily V (TRPV) mRNA expression in the mouse inner ear ganglia after kanamycin challenge. Hearing Research, 201(1-2), 132-144.

Lambert, D. G. (2008). The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. Nature reviews Drug discovery, 7(8), 694.

Lawrence, M. (1966). Histological evidence for localized radial flow of endolymph. Archives of Otolaryngology, 83(5), 406-412.

Leijon, S., Magnusson, A. K. (2014). Physiological characterization of vestibular efferent brainstem neurons using a transgenic mouse model. Public Library of Science, 9(5), e98277.

León-Olea, M., Miller-Pérez, C., Cruz, R., Antón, B., Vega, R., Soto, E. (2001). Immunohistochemical localization and electrophysiological action of nociceptin/orphanin-FQ in the snail (Helix aspersa) neurons. Neuroscience Letters, 316(3), 141-144.

Limón, A., Pérez, C., Vega, R., Soto, E. (2005). Ca2+-activated K+-current density is correlated with soma size in rat vestibular-afferent neurons in culture. Journal of Neurophysiology, 94(6), 3751-3761.

Liu, X. P., Wooltorton, J. R., Gaboyard-Niay, S., Yang, F. C., Lysakowski, A., Eatock, R. A. (2016). Sodium channel diversity in the vestibular ganglion: NaV1. 5, NaV1. 8, and tetrodotoxin-sensitive currents. Journal of Neurophysiology, 115(5), 2536-2555.

Lowenstein, O. T. T. O. (1936). The equilibrium function of the vertebrate labyrinth. Biological Reviews. 11, 113-145.

Matthews, B. L., Ryu, J. H., Bockaneck, C. (1989). Vestibular contribution to spatial orientation. Acta Oto-Laryngologica, 108(sup468), 149-154.

Mercado, F., López, I. A., Acuna, D., Vega, R., Soto, E. (2006). Acid-sensing ionic channels in the rat vestibular endorgans and ganglia. Journal of Neurophysiology, 96(3), 1615-1624.

Merighi, A., Salio, C., Ferrini, F., Lossi, L. (2011). Neuromodulatory function of neuropeptides in the normal CNS. Journal of Chemical Neuroanatomy, 42(4), 276-287.

Mogil, J. S., Pasternak, G. W. (2001). The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. Pharmacological Reviews, 53(3), 381-415.

Neal, C. R., Mansour, A., Reinscheid, R., Nothacker, H. P., Civelli, O., Akil, H., Watson, S. J. (1999). Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: Comparison of ORL1 receptor mRNA expression with 125I-[14Tyr] -orphanin FQ binding. Journal of Comparative Neurology, 412(4), 563-605.

Norma Oficial Mexicana (1999). NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Patuzzi, R. (2011). Ion flow in stria vascularis and the production and regulation of cochlear endolymph and the endolymphatic potential. Hearing Research, 277(1-2), 4-19.

Popper, N., Fay, R. (1997). Evolution of the ear and hearing: issues and questions. Brain, Behavior and Evolution, 50(4), 213-221.

Rennie, K. J., Streeter, M. A., Benke, T. A., Moritz, A. T. (2005). Modeling channel properties in vestibular calyx terminals. Biomedical Sciences Instrumentation, 41, 358-363.

Rosas, N., Ruiz, M., Gibrán, O., Andrade, P. (2013) Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Méniere en los tres niveles de atención en México: Secretaría de Salud. Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica. ISSSTE-698-13.

Rutka, J. A. (2004). Physiology of the vestibular system. Ototoxicity. Hamilton, Canada: BC Decker, 20-27.

Ryugo, D. K., Fay, R. R., Popper, A. N. (Eds.). (2010). Auditory and vestibular efferents (Vol. 38). Springer Science & Business Media.

Ryugo, D. K. (2011). Introduction to efferent systems. In Auditory and vestibular efferents (pp. 1-15). Springer, New York, NY.

Seseña, E., Vega, R., Soto, E. (2014). Activation of μ-opioid receptors inhibits calcium-currents in the vestibular afferent neurons of the rat through a cAMP dependent mechanism. Frontiers in Cellular Neuroscience, 8, 90.

Seseña, E., Ortega, A., Vega, R., Soto, E. (2016). The ORL-1 receptor activation inhibits the voltage gate calcium current and the excitability in vestibular afferent neurons of rat. Program No. 804.04/EE7. 2016 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2016. Online.

Soto, E., Flores, A., Eróstegui, C., Vega, R. (1993). Evidence for NMDA receptor in the afferent synaptic transmission of the vestibular system. Brain Research, 633, 289-296.

Soto, E., Vega, R. (2010). Neuropharmacology of vestibular system disorders. Current neuropharmacology, 8(1), 26-40.

Soto, E., Vega, R., Seseña, E. (2013). Neuropharmacological basis of vestibular system disorder treatment. Journal of Vestibular Research, 23(3), 119-137.

Stackman, R. W., Herbert, A. M. (2002). Rats with lesions of the vestibular system require a visual landmark for spatial navigation. Behavioural Brain Research, 128(1), 27-40.

Sterkers, O., Ferrary, E., Amiel, C. (1988). Production of inner ear fluids. Physiological Reviews, 68(4), 1083-1128.

Stoelzle-Feix, S. (2014). State-of-the-art automated patch clamp: heat activation, action potentials, and high throughput in ion channel screening. In Patch-Clamp Methods and Protocols (pp. 65-80). Humana Press, New York, NY.

Sugai, T., Sugitani, M., Ooyama, H. (1991). Effects of the activation of the divergent efferent fibers on the spontaneous activity of vestibular afferent fibers in the Toad. Japanese Journal of Physiology, 41, 217-232.

Sulaiman, M. R., Niklasson, M., Tham, R., Dutia, M. B. (1999). Modulation of vestibular function by nociceptin/orphanin FQ: an in vivo and in vitro study. Brain Research, 828(1-2), 74-82.

Takimoto, Y., Ishida, Y., Nakamura, Y., Kamakura, T., Yamada, T., Kondo, M., ... Okazaki, S. (2014). 5-HT3 receptor expression in the mouse vestibular ganglion. Brain Research, 1557, 74-82.

Tariq, S., Nurulain, S. M., Tekes, K., Adeghate, E. (2013). Deciphering intracellular localization and physiological role of nociceptin and nocistatin. Peptides, 43, 174-183.

Toll, L., Bruchas, M. R., Cox, B. M., Zaveri, N. T. (2016). Nociceptin/orphanin FQ receptor structure, signaling, ligands, functions, and interactions with opioid systems. Pharmacological Reviews, 68(2), 419-457.

Vega, R., Soto, E. (2003). Opioid receptors mediate a postsynaptic facilitation and a presynaptic inhibition at the afferent synapse of axolotl vestibular hair cells. Neuroscience, 118(1), 75-85.

Vidal, P. P., Cullen, K., Curthoys, I. S., Du Lac, S., Holstein, G., Idoux, E., Smith, P. (2015). The vestibular system. The Rat Nervous System (4ta edición) (pp. 805-864).

Yoder, R. M., Taube, J. S. (2014). The vestibular contribution to the head direction signal and navigation. Frontiers in Integrative Neuroscience, 8, 32.